MENSCHLICHE IMMUNGLOBULINGENE VOM K - TYP VARIABLE GENSEGMENTE INNERHALB UND AUSSERHALB DES K - LOCUS

ERIKA LÖTSCHER

1988

Disbui. München

UNIV.
LONDON
LIBR.

Menschliche Immunglobulingene vom K-Typ: Variable Gensegmente innerhalb und außerhalb des K-Locus

Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Erika Lötscher
aus Buttisholz/Schweiz

München 1988

vorgelegt am 10. Dezember 1987

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Böck

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Gutensohn

Sondergutachter : Professor Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.88

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Dezember 1983 bis Juli 1987 durchgeführt.

Herrn Professor Zachau danke ich für seine Unterstützung und seine wertvollen Denkanstösse. Allen Kollegen der Abteilung danke ich für gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

E. Lötscher, K.-H. Grzeschik, H. G. Bauer, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger und H. G. Zachau. Nature 320, 456-458 (1986)

E. Lötscher, W. Siwka, F.-J. Zimmer, F. Grummt und H. G. Zachau (eingereicht)

E. Lötscher, F.-J. Zimmer, T. Klopstock, K.-H. Grzeschik, R. Jaenichen, B. Straubinger und H. G. Zachau (in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung.....1

2. Ergebnisse.....5

2.1. Chromosomale Lokalisierung der V_K-Regionen des menschlichen K-Locus.....5

2.1.1. Methodisches Vorgehen der chromosomalen Lokalisierungsanalysen.....5

2.1.1.1. Konstruktionsprinzip spezifischer Lokalisierungsproben.....7

2.1.1.2. Charakterisierung der verwendeten Hybridzellinien...8

2.1.1.3. Optimierung der Hybridisierungsbedingungen der Lokalisierungsanalysen.....12

2.2. V_K-Regionen innerhalb des K-Locus auf Chromosom 2.....13

2.2.1. Die A-Regionen.....13

2.2.2. Die L-Regionen.....19

2.2.3. Die O-Regionen.....20

2.2.4. Die W-Regionen.....25

2.2.5. Die cos108-Region.....27

2.3. V_K-Regionen, die sicher oder möglicherweise außerhalb des K-Locus liegen.....31

2.3.1. Die Chr1-Region.....32

2.3.2. Die Chr22-Region.....34

2.3.3. Die cos118-Region.....36

2.3.4. Die cos138-Region.....39

2.3.4. Die cos219-Region.....40

2.3.5. Die Z-Familie.....40

2.4. Struktur einiger transponierter V_K-Regionen.....42

2.4.1. Sequenzanalyse zweier transponierter V_KI-Gene aus der Chr1- und cos118-Region.....42

2.4.1.1. Kartierung und Subklonierung der Genbereiche.....42

2.4.1.2. Sequenzen der V_KI-Gene.....44

2.4.2. Sequenzvergleich transponierter V_KI-Gene.....46

2.5. Die konservierten 5'-Flanken einiger transponierter V_KI-Gene enthalten ARS-Elemente.....48

2.5.1. Mehrere Fragmente aus der konservierten 5'-Flanke des Gens der Chr1-Region weisen eine ARS-Aktivität auf.....49

2.5.2. Einengung der für die ARS-Aktivität verantwortlichen Sequenzen.....53

3. Diskussion.....58

3.1. Ziele der Untersuchungen zur Struktur des menschlichen K-Locus.....58

3.2. Identifizierung von Ligierungsartefakten mit Hilfe chromosomaler Lokalisierungsanalysen.....59

3.3. Anzahl der transponierten und nicht-transponierten V_K-Gene.....60

3.4. Gemeinsame Vorläuferregion der transponierten V_K-Regionen.....61

3.5. Überreplikation als möglicher Mechanismus der Entstehung der menschlichen V_K-Orphonregionen.....64

3.6. Unterschiedliche Sequenzmotive besitzen ARS-Aktivität.....66

3.7. Evolution der menschlichen V_K-Orphonregionen.....71

4. Material und Methoden.....74

4.1. Materialien.....74

4.1.1. Chemikalien und Enzyme.....74

4.1.2. Bakterienstämme, DNA-Vektoren und DNAs.....75

4.1.3. Cosmidgenbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone..75

4.2. Methoden.....76

4.2.1. Radioaktive Markierung von DNA.....76

4.2.2. DNA-Transfer und Hybridisierung.....76

4.2.3. Herstellung von Koloniefiltern.....77

4.2.4. Präparation von DNA.....78

4.2.5. Präparation von Oligonukleotiden.....78

4.2.6. Restriktionsnukleasespaltungen.....79

4.2.7. Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....79

4.2.8. Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-, pUC9- und pBR322-Vektoren.....80

4.2.9. Transformationen.....80

4.2.10. Auffüllen überhängender Enden und Linker-Addition..81

4.2.11. Sequenzierung.....81

4.2.12. Computerprogramme.....82

5. Zusammenfassung.....83

6. Literaturverzeichnis.....86

7. Abkürzungsverzeichnis.....92

Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

Die menschlichen Immunglobulingene des K-Typs bilden eine Multigenfamilie, die auf Chromosom 2 lokalisiert wurde (1,2). Solche Multigenfamilien, bei denen die meisten oder alle Mitglieder in einem Locus vorliegen, stellen eine allgemeine Organisationsform von identischen oder verwandten Gensequenzen dar. Weitere Beispiele für Multigenfamilien dieser Art sind die V_H- und V_λ-Gensequenzen (Übersicht Ref.3), die MHC-Gene der Maus und des Menschen (4, 5) sowie die menschlichen Globin- (6) und α-Interferon-Gene (7). Neben dieser Organisationsform existiert im eukaryontischen Genom eine weitere Form von Multigenfamilien, deren Mitglieder auf verschiedenen Chromosomen vorliegen. Beispiele dafür sind die tRNA-Gene der Hefe (8) und die vier für ribosomale Proteine codierenden Genfamilien der Maus (9).

Obwohl mehrere Multigenfamilien charakterisiert worden sind, ist sehr wenig über deren Evolutionsmechanismen bekannt. Der Grund dafür ist, daß die Entstehung vieler Genfamilien auf relativ alte Ereignisse zurückzuführen ist. Im Verlauf der Evolution können die ursprünglichen Sequenzen durch Mutationen derart verändert worden sein, daß sie keine Homologie zur Vorläufersequenz mehr aufweisen.

Theoretisch kann die Entstehung von Multigenfamilien in ein primäres und in ein sekundäres Stadium eingeteilt werden (Übersicht Ref.10). Das primäre Stadium beinhaltet Duplikationsereignisse eines Vorläufergens; die dabei entstandenen Genkopien können im sekundären Stadium durch verschiedene Mechanismen mutiert werden.

Als mögliche Duplikationsereignisse des primären Stadiums werden im allgemeinen fünf verschiedene Kategorien von molekularen Prozessen diskutiert (Übersicht Ref.10; 11): (a) zufällige, nicht-homologe Rekombinationen; (b) ungleiche, aber homologe Rekombinationen zwischen repetitiven Elementen, die auf beiden Seiten des Vorläufergens vorkommen; (c) Genamplifikationen, die auf

Überreplikationsereignisse zurückzuführen sind; (d) duplikative Transpositionsereignisse, bei denen RNA-Zwischenprodukte involviert sind und (e) duplikative Transposon-artige Prozesse, die nur DNA-Zwischenstufen enthalten.

Das erste Duplikationsereignis, das zu zwei Kopien des Vorläufergens führt, bildet der kritischste Schritt in der Evolution einer Multigenfamilie. Die Wahrscheinlichkeit aller weiteren Duplikationen und sekundären Mutationen in den Kopien des Vorläufergens ist im Vergleich zu derjenigen des ersten Duplikationsereignisses größer. Der Grund dafür ist, daß die Rekombinationsfrequenzen zwischen homologen Sequenzen höher sind als zwischen nicht-homologen DNAs (Übersicht Ref.10).

Hinsichtlich der Frage, auf welche Weise sich die duplizierten Sequenzen sekundär in der Evolution weiter entwickeln, werden im wesentlichen zwei verschiedene Theorien diskutiert: die Selektionstheorie (Übersicht Ref.10) und die neutrale Theorie (12). Während nach der erstgenannten Theorie die Erhaltung der Homogenität der duplizierten Sequenzen vom Selektionsdruck abhängig ist, kann mit der neutralen Theorie die hohe Ähnlichkeit von repetitiven Sequenzen erklärt werden, auf denen kein Selektionsdruck lastet.

Nach den beiden Theorien können die aus den primären Duplikationsereignissen resultierenden Kopien des Vorläufergens bei Fehlen eines Selektionsdrucks oder bei Fehlen von "molecular drive" Ereignissen (13, neutrale Theorie) im Verlauf der Evolution durch Basenpaarsubstitutionen, Deletionen, Duplikationen und Insertionen verändert werden. (Übersicht Ref.10). Diese Mutationen führen zu einer Vielfalt von verschiedenen Sequenzen, die in der Folge wiederum Ansatzpunkte für Selektion und genetischen Drift (Übersicht Ref.10) sowie Ansatzpunkte für "molecular drive"-Ereignisse (13) werden können. Im weiteren ist es möglich, daß die durch die sekundären Ereignisse entstandenen Mutationen in den duplizierten Sequenzen durch Genkonversion ganz oder teilweise wieder rückgängig gemacht werden (Übersicht Ref.14). Der Genkonversions-Mechanismus sorgt einerseits dafür, daß die Homogenität zwischen Mitgliedern von Multigenfamilien erhalten bleibt. Andererseits können durch den gleichen Mechanismus Sequenzunterschie-

de zwischen duplizierten Bereichen erzeugt werden. In weiteren sekundären Ereignissen, wie zum Beispiel durch einen Schwesterchromatid-Austausch, kann die Genzahl von Multigenfamilien entweder erhöht oder reduziert werden (Übersicht Ref.10).

Durch die sekundären Mutationen in den Kopien des Vorläufergens können DNA-Bereiche entstehen, die für kein Genprodukt mehr codieren. Es ist jedoch auch möglich, daß durch bestimmte Mutationen in den duplizierten Sequenzen Gene mit verwandten oder neuen Funktionen entstehen. Ein Beispiel für eine solche Evolution sind die ß-Globingene des Menschen. Die Genprodukte dieser Familie unterscheiden sich hinsichtlich der Affinität zu Sauerstoff und zudem werden die entsprechenden Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung des Organismus exprimiert (15). Eine weitere Möglichkeit, wie die duplizierten Sequenzen sich in der Evolution entwickeln können, kann anhand der variablen Gensegmente der leichten und der schweren Kette der Immunglobuline gezeigt werden. Bei diesen Genfamilien unterscheiden sich die Gensegmente jeweils geringfügig voneinander. Durch die Diversität der variablen Gensegmente wird eine Grundvoraussetzung für das weite Spektrum der Antikörperspezifitäten geschaffen (Übersicht Ref.3).

Die Entstehung von Multigenfamilien, deren Mitglieder wie bei der V_K-Multigenfamilie in einem Locus organisiert sind, kann am einfachsten mit Rekombinationsereignissen zwischen Schwesterchromatiden erklärt werden. Genauere Analysen einiger Multigenfamilien dieser Art haben jedoch gezeigt, daß zusätzlich zu dem hypothetischen Mechanismus eines Schwesterchromatid-Austausches möglicherweise weitere Mechanismen an deren Evolution beteiligt gewesen sind. So wurden bei einigen V-Genen des menschlichen K-Locus in den 5'-und 3'-Flanken invertierte Sequenzelemente gefunden, die auf Transposon-artige Mechanismen schließen lassen (11). Zudem konnte bei vielen Multigenfamilien gezeigt werden, daß sich einzelne Mitglieder außerhalb der jeweiligen Loci befinden. Beispiele dafür sind die transponierten Gene der Histongenfamilien des Seeigels und der Drosophila (16) und die transponierten Gene der rRNA-Genfamilien der Hefe (16). Solch transponierte Gene, die

im allgemeinen unter dem Begriff "Orphons" zusammengefaßt werden (16), stellen häufig prozessierte Genprodukte dar, deren Entstehung wahrscheinlich auf Retrotranskription eines Transkripts beruht (Übersicht Ref.17).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Beiträge zur Analyse der menschlichen V_K-Regionen geliefert werden. Diese Beiträge setzten sich vorerst aus den Sequenzanalysen einiger V_K-Gensegmente sowie aus den Erweiterungen der Genkarten zweier V_K-Regionen durch "chromosomal walking"-Experimente zusammen. Da diese Regionen über weite genomische Abschnitte jeweils nur ein einzelnes V_K-Gensegment aufweisen, ergab sich die Notwendigkeit, die chromosomale Lokalisierung der entsprechenden V_K-Regionen zu überprüfen. Die Analysen der transponierten V_K-Regionen, den sogenannten Orphons, die bei diesen Versuchen gefunden wurden, entwickelten sich im folgenden zu einem Schwerpunkt der Arbeit. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Frage, welche Mechanismen für die Entstehung der V_K-Orphonregionen verantwortlich gewesen sein könnten. In diesem Zusammenhang waren hauptsächlich die folgenden Aspekte interessant: (i) Ausmaß der Verwandtschaft der transponierten V_K-Regionen; (ii) Existenz entsprechender Mutterkopien im K-Locus; (iii) Vorhandensein von Intronsequenzen bei den gesprungenen V_K-Genen. Da die hohe Homologie in den Restriktionskarten der V_K-Orphonregionen des Menschen eher auf junge Ereignisse schließen lassen, boten die transponierten Regionen ein interessantes Ausgangsmaterial, um Duplikations- und Transpositionsmechanismen innerhalb der Multigenfamilie zu analysieren. Das Ziel dabei war, auf Sequenzebene Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen zu finden.

2. Ergebnisse

2.1. Chromosomale Lokalisierung der V_K-Regionen des menschlichen K-Locus

Im Verlauf der Analysen des menschlichen K-Locus wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Zachau verschiedene V_K-Regionen charakterisiert. Die meisten davon enthalten zahlreiche V_K-Gensegmente und werden durch mehrere Überlappende Cosmidklone dargestellt. Zusätzlich zu diesen Regionen, den sogenannten A-, B-, L-, O- und W-Regionen, wurden weitere etabliert, die jeweils nur ein einzelnes oder wenige V_K-Gensegmente aufweisen. Da auch bei den extendierten Genkarten dieser Regionen keine zusätzlichen V_K-Gene identifiziert werden konnten, stellte sich die Frage, ob die einzelnen V_K-Gene Orphonbereiche, d.h. V_K-Bereiche außerhalb des K-Locus repräsentieren.

Es war bekannt, daß der menschliche K-Locus auf Chromosom 2 liegt (1,2). Um die Frage einer möglichen Existenz von Orphonregionen zu klären, wurden die fraglichen Bereiche mit Hilfe somatischer Hybridzellinien chromosomal lokalisiert. In einem weiteren Schritt wurden zusätzlich zu den Orphonkandidaten auch die chromosomalen Lokalisierungen der A-, L-, O- und W-Regionen überprüft. Darüberhinaus sollten Ligierungsartefakt verdächtige Bereiche mit Hilfe chromosomaler Lokalisierungsanalysen identifiziert werden (3.2.).

Eine Übersicht über alle durchgeführten chromosomalen Lokalisierungsanalysen ist in Tabelle 1 gegeben.

2.1.1. Methodisches Vorgehen der chromosomalen Lokalisierungsanalysen

Die chromosomalen Lokalisierungsanalysen wurden mit Hilfe verschiedener somatischer Hybridzellinien (18-24) durchgeführt, die

Tabelle 1: Übersicht über die chromosomalen Lokalisierungsanalysen der V_K-Regionen

V_K-Region	Lokalisierungsklon	Zitat	Chromosomale Lage
A	m163-1	31	Chromosom 2
O	m217-1	vorl. Arbeit	Chromosom 2
O	m143-1	46	Chromosom 2
O	m146-8	47	Chromosom 2
O	m147-6	47	außerhalb Chr2
L	m 21-1	44	Chromosom 2
W	m167-1	46	Chromosom 2
W	m654-1	46	Chromosom 2
W	m170-1	51	Hauptsignal auf Chr2
cos108	m108-1	vorl. Arbeit	Chromosom 2 + 9
cos219	m219-1	vorl. Arbeit	Chromosom 5
Chr1	m115-20	56	Chromosom 1
Chr22	m119-2	55 + 56	Chromosom 22
Chr22	m120-12	55	Chromosom 22 + 2
cos138	m138-4	vorl. Arbeit	nicht bestimmbar
Z *	m158-1	59	nicht bestimmbar
Z	m161-1	59	nicht bestimmbar
Z *	m210-1	59	nicht bestimmbar

Die für die Bezeichnung der Klone verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis (7.) erklärt. Die Lokalisierungsanalysen, die mit einem Stern versehen sind, wurden von B. Straubinger (49, 59) durchgeführt.

freundlicherweise von Professor K.-H. Grzeschik, Universität Münster, zur Verfügung gestellt wurden. Das Prinzip dieser Lokalisierungsmethode beruht darauf, daß spezifische Proben zu DNAs verschiedener Hybridzellinien hybridisiert werden, die unterschiedliche Karyotypen aufweisen. Anhand des mit der Hybridisierungsprobe erhaltenen Segregationsmusters ist es möglich, die chromosomale Lage der entsprechenden Region zu ermitteln.

2.1.1.1. Konstruktionsprinzip spezifischer Lokalisierungsproben

Die Anforderungen, die an eine Lokalisierungsprobe gestellt werden, sind im wesentlichen identisch mit denjenigen eines Extensionssuchklons. Bei beiden werden Fragmente benötigt, die, wenn möglich, nur einmal im Genom vorkommen. Falls solche Fragmente nicht identifizierbar sind, können für die Lokalisierungsanalysen DNA-Bereiche eingesetzt werden, die wenige Kopien im Genom aufweisen. In diesem Fall ist es jedoch notwendig, daß sich der hybridisierende Bereich der genomischen Region, die lokalisiert werden sollte, deutlich von den andern hybridisierenden Bereichen unterscheidet.

Die Vorgehensweise der Konstruktion von Lokalisierungsproben ist folgende: Kartierungsfilter der entsprechenden DNA-Regionen werden mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert. Sequenzen, die mehr als 100 Kopien im Genom aufweisen, ergeben ein Hybridisierungssignal (25). Die Kopienzahl von nicht-hybridisierenden Fragmenten wird mit Hilfe einer zweiten Hybridisierung ermittelt. Dazu werden diese Fragmente isoliert, radioaktiv markiert und zu gespaltener Plazenta-DNA hybridisiert. Anhand des Bandenmusters und der Intensität der Signale auf dem dazugehörenden Autoradiogramm kann die ungefähre Kopienzahl des radioaktiv markierten Fragments bestimmt werden.

Für die chromosomalen Lokalisierungsanlysen der A-, L-, O- und W-Regionen wurden im allgemeinen die von der Arbeitsgruppe erstellten Extensionssuchklone eingesetzt. Von einzelnen V_K-Regionen existierten zum damaligen Zeitpunkt keine spezifischen

Subklone. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit von diesen Regionen Lokalisierungsklone konstruiert, mit deren Hilfe die Analysen durchgeführt werden konnten. Die Beschreibung dieser Klone erfolgt in den Abschnitten, in denen die Lokalisierungsdaten aufgeführt sind.

2.1.1.2. Charakterisierung der verwendeten Hybridzellinien

Für die Lokalisierungsanalysen sind insgesamt 29 verschiedene Hybridzellinien eingesetzt worden, die von Professor Grzeschik, Universität Münster, etabliert und charakterisiert wurden. Diese Zellinien setzen sich aus 27 Maus-Mensch- und zwei Hamster-Mensch-Zellhybriden zusammen. Die erstgenannten wurden durch Fusion von Maus RAG- oder A9-Zellen mit menschlichen Fibroblasten erzeugt, während die beiden Hamster-Mensch-Zellhybride aus der Verschmelzung von Hamster V79-Zellen mit menschlichen Lymphozyten resultierten (18-24). Charakteristisch für solche Hybridzellen ist, daß im allgemeinen alle Chromosomen des Nagergenoms stabil erhalten werden. Im Gegensatz dazu ist der menschliche Chromosomensatz in der Fusionszelle unvollständig und instabil. Aus diesem Grund ist es notwendig, den Karyotyp von kultivierten Hybridzellinien kontinuierlich zu überprüfen, bevor diese für weitere Analysen verwendet werden können. Die Bestimmung und Überprüfung der Karyotypen der eingestzten Hybridzellinien erfolgte durch biochemische und cytologische Analysen (18-24). Die Daten dieser Analysen sind in Abb.1 schematisch zusammengefaßt. Damit es keine Verwechslungen mit den Referenzennummern gibt, werden im folgenden Text den Nummern der Hybridzellinien die Buchstaben "HZ" für Hybridzellinie vorangestellt.

Wie aus Abb.1 hervorgeht, enthalten zwei der Hybridzellinien, HZ2 und HZ10, das vollständige Chromosom 2, bei vier weiteren (HZ5, HZ15, HZ31, HZ32) wurde jeweils nur ein Bruchstück des Chromosoms 2 nachgewiesen. Durch einen Test mit der C_K-Probe (26), die auf Chromosom 2 liegt (1,2), kann gezeigt werden, daß die beiden erstgenannten Zellinien erwartungsgemäss ein Hybridisierungssignal geben, während von den andern vier Hybridzell-

Menschliche Chromosomen

Zellinie		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
1	GM 3104																								
2	B82 MS2 1a-14																								
3	RAG Anly 1																								
4	RAG PJ 7-2																								
5	RAG PJ 5-15																								
6	RAG 194 7																								
7	RAG 194 5-5																								
8	RAG Go 4																								
9	RAG Su 3-1-2-3																								
10	A9 Su 1-2																								
11	V79 Ly 3-2																								
12	V79 Ly 3-3																								
13	P3																								
14	A9 GM 89 9c-7																								
15	A9 MS 58 2b																								
16	RAG GM 97 8-13																								
17	RAG																								

Menschliche Chromosomen

	Zellinie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
18	RAG Ru 1a-5-11			■	■			◢							■							■	■		
19	RAG Ru 6-19							◢																■	
20	RAG Ru 4-13	■		■		◢	■	◢			◢				■		■	■		◢		■	■	◢	■
21	A9 JT 2-21-14					■	◢	◢					■			■	■	■	■			■		◢	
22	A9 JT X-28-13						◢	◢														◢			
23	5387-3 cl 10							■																	
24	RAG 194 6-13			◢	■								■	■	■	◢								◢	
25	RAG MH 8-7	■		■	■			◢	■				■	■	■	◢			■					■	
26	RAG GN 6a-8-4						■	◢														◢			
27	A9 JT 2-18					■	◢	◢										■	■			■			
28	RAG 610 2-18	■		■	■	■	◢	■	■			■		■		■	■		◢	■	■	■		◢	
29	RAG 610 5-23	◢		■		■	◢						■	■	■	■			◢		■		■	■	
30	RAG 610 3-4			■		■	◢		■				■	■	■	■	■	■	◢		■	■	■		
31	A9 Call 1-9-9		◢				◢							■	■	■			◢	■	■	■	■		
32	A9 Call 1-13		◢				◢							■	■	■			■			■	■		
33	GM 3092	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
34	A9																								

Abb. 1: Schematische Darstellung der Karyotypen der Hybridzellinien, die für die chromosomalen Lokalisierungsanalysen eingesetzt wurden

Die in der Abb.1 dargestellten Karyotypen der Hybridzellinien wurden von Professor K.-H. Grzeschik, Universität Münster, etabliert und charakterisiert (18-24). In der senkrechten Spalte ist die Bezeichnung der Hybridzellinien angegeben; die fortlaufenden Nummern stimmen mit denjenigen auf den Autoradiogrammen überein (Abb. 7a-d). Im Text werden die Hybridzellinien mit HZ 1-34 bezeichnet. In der waagrechten Reihe sind alle menschlichen Chromosomen aufgeführt. Ausgefüllte Quadrarte bedeuten, daß in der betreffenden Hybridzellinie das vollständige Chromosom vorhanden ist, während bei den halb ausgefüllten Quadraten nur ein Teil des Chromosoms nachgewiesen wurde.
Für die genauere Lokalisierung der Chr1-Region auf Chromosom 1 wurden weitere Hybridzellinien eingesetzt, die ebenfalls von Professor K.-H. Grzeschik zur Verfügung gestellt wurden. Die identifizierten Chromosom 1-Fragmente dieser Zellinien sind im folgenden Text zu dieser Legende aufgeführt. Die Zellinien, die mit der Probe m115-20 hybridisieren bzw. nicht hybridisieren, sind durch die Symbole (+) bzw. (-) gekennzeichnet. RAG GM97 8-13-3: $1q^-$(+); RAG GM610 4-5-1: $1q^-$ (-); RAG GM201 11-10-3: $17p^+$ (-); RAG Ha 6a-7: $1p^+$ (+); RAG GM201 11-11-4: $1p^-$ (+); RAG F15 6-1-8-: $1p^-$ (+); RAG F277 1b-9: $1p^-$ (+); RAG F15 4-2: $21q^+$ (-); RAG F15 3-8-7: $1p^-$ (+).

linien nur die Zellinien HZ5 und HZ31 mit der C_K-Probe hybridisieren. Weiter geht aus dem C_K-Hybridisierungstest hervor, daß die Intensitäten der Signale bei den vier C_K-positiven Zellinien zum Teil unterschiedlich sind. Folgende Gründe können dafür verantwortlich sein: (i) Wie bereits erwähnt, ist das Genom der Hybridzellinien instabil. Im Verlauf der Zellkultivierung wird der Chromosomensatz in diesen Zellinien sukzessive reduziert. Auf diese Weise ist es möglich, daß ein Teil der Zellen das ursprünglich vorhandene Chromosom 2 oder Chromosom 2-Bruchstück nicht mehr besitzt. (ii) Weiter ist die Signalstärke vom Verhältnis der Chromosom 2-DNA zur Gesamt-DNA-Menge abhängig. Wenn pro Hybridzellinie eine konstante DNA-Menge für die Lokalisierungsanalysen eingesetzt wird, kann das entsprechende DNA-Verhältnis je nach Karyotyp der Zellinie stark variieren. Dieser Punkt kann ebenfalls zum beobachteten Unterschied der Signalstärken führen.

2.1.1.3. Optimierung der Hybridisierungsbedingungen der Lokalisierungsanalysen

Die Filter mit den transferierten DNAs der Hybridzellinien wurden wie folgt hergestellt: 10 µg Hybridzell-DNA wurden entweder mit der Restriktionsnuklease BglII oder EcoRI gespalten. Die Spaltprodukte wurden auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend entweder auf Biodyne A-Membranen (4.2.2.) oder auf GeneScreen-Filter (4.2.2.) übertragen. Die genomischen Blots für die ersten Hybridisierungen wurden freundlicherweise von Professor Grzeschik, Universität Münster, zur Verfügung gestellt, alle weiteren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigt. Da die verwendeten Hybridzellinien sowohl menschliche als auch Nager-DNA enthalten, mußten für die folgenden Hybridisierungen zunächst die Bedingungen ermittelt werden, bei denen die beiden DNAs nicht kreuzhybridisieren. Zu diesem Zweck wurden folgende drei Stringenzen im letzten Waschschritt getestet: 2xSSC/68°C, 0,5xSSC/68°C und 0,2xSSC/68°C. Es stellte sich heraus, daß bei einer Stringenz von 2xSSC/68°C menschliche DNA-Proben verwandte Nagersequenzen erkennen. Diese Kreuzhybridisierung verschwindet, wenn die Stringenz von 0,5xSSC/68°C gewählt wird. Wenn die Salzkonzentration weiter auf 0,2xSSC reduziert wird, gibt es zwar keine Kreuzhybridisierung, doch die Intensitäten der Hybridisierungssignale nehmen deutlich ab.

Mit diesen Daten ließen sich die für die Lokalisierungsanalysen am besten geeigneten Waschbedingungen festlegen: 0,5xSSC/68°C. Anstelle des SSC-Puffers wurde in einigen Fällen ein Natriumphosphat-Puffer der gleichen Stringenz (40 mM Natriumphosphat-Lösung pH 7,2) benutzt. Im Übrigen wurden die Hybridisierungen so durchgeführt, wie in Ref.27 und 28 beschrieben.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß die Stringenz, bei der keine Kreuzhybridisierung zwischen Nager- und Humansequenzen festgestellt wurde, nur für DNA-Sequenzen gilt, die weder ein V_K-Gensegment noch dessen 5'- und 3'-Flanken darstellen. Da viele der Human- und Nager-V_K-Gene untereinander ähnlich sind, erkennen diese menschlichen V_K-Genbereiche die entsprechenden DNA-Sequenzen im Nagergenom auch unter stringenten Bedingungen (0,5xSSC/68°

C oder 4o mM Natriumphosphat pH 7,2/68°C). Diese Kreuzhybridisierung konnte für die beiden Subgruppen V_KI und V_KIII nachgewiesen werden. Die Hybridisierungen wurden jeweils mit den radioaktiv markierten Genproben m1-3 (29) und m21-4 (11) durchgeführt. Im Gegensatz zu diesen Proben wurde bei der gleichen Stringenz keine Kreuzhybridisierung mit der menschlichen V_K-Genprobe der Subgruppe II (m607V-3; Ref.30) erhalten. Offensichtlich ist die Divergenz zwischen Mensch und Maus bei den V_KII-Genen größer als bei den Gensegmenten der Subgruppen I und III.

2.2. V_K-Regionen innerhalb des K-Locus auf Chromosom 2

2.2.1. Die A-Regionen

Die A-Regionen des K-Locus enthalten insgesamt 28 V_K-Gensegmente und erstrecken sich über einen genomischen Abschnitt von ungefähr 300 kb (31, Abb.2). Durch Hybridisierungsexperimente und Restriktionskartenvergleiche konnte B. Straubinger zeigen, daß die A-Regionen dupliziert sind (31). Wie bei den anderen duplizierten Bereichen des K-Locus (L, O, W) unterscheiden sich die Duplikate hinsichtlich der Restriktionsspaltstellen nur geringfügig voneinander. Mit Hilfe dieser Unterschiede konnten die duplizierten A-Regionen von möglichen allelischen Varianten unterschieden werden.

Abb.2: Gesamtdarstellung der duplizierten A-Regionen

Abb.2: Die A-Regionen, die im wesentlichen von B.Straubinger etabliert und bearbeitet wurden (31), sind zusammenfassend dargestellt. Die V_K-Gene sind durch ausgefüllte Balken gekennzeichnet; bei sequenzierten Genen ist der Signalpeptidanteil jeweils gesondert markiert. Die Gene A11 und A27 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert. Die Lage des Subklons m163-1 ist durch eine ausgezogene Linie dargestellt.

Sequenzanalyse zweier dupliziertER V_KIII-Gene der A-Regionen des K-Locus. Im Rahmen des V_K-Gesamtprojekts der Arbeitsgruppe wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden duplizierten V_KIII-Gene A11 und A27 der A-Regionen des K-Locus sequenziert.

Vorgehensweise. Aus dem Cosmidklon cos109 wurde ein 9 kb langes BamHI-SmaI-Fragment, welches das A11-Gen enthält, isoliert; aus dem Cosmidklon cos659 wurde ein 5 kb langes BamHI-BglII-Fragment, auf dem das A27-Gen liegt, isoliert. Bei beiden Fragmenten konnte durch Restriktionsspaltungen und Hybridisierungsexperimente mit der V_KIII-spezifischen Probe m21-4 (11) gezeigt werden, daß die Gene A11 und A27 jeweils auf einem ungefähr 700 bp langen PvuII-Fragment lokalisiert sind. Diese Fragmente wurden in M13-Vektoren kloniert und anschließend sequenziert. Mit Hilfe der dabei erhaltenen Sequenzen konnte eine, auf den Fragmenten nur einmal vorkommende und ungefähr in der Mitte liegende HpaII-Restriktionspaltstelle ermittelt werden. Diese HpaII-Stelle wurde für die Gegenstrangsequenzierung benutzt. Die genaue Sequenzierungsstrategie ist in Abb.3 dargestellt; eine Übersicht über die Sequenzierungsklone ist in Tabelle 2 gegeben.

Sequenzen der duplizierten A11- und A27-Gene. In Abb.4 sind die Nukleotidsequenzen der beiden Gene zusammen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen gezeigt. Beide Gene stellen typische V_K-Gene der Subgruppe III dar. Keine der für diese Subgruppe typischen invarianten Aminosäuren (32) ist ausgetauscht. Die Homologie der Gene A11 und A27 beträgt in den sequenzierten Bereichen, welche zusätzlich zu den codierenden Gensequenzen 104 bp der 5'- und 65 bp der 3'-Flanke enthalten, 98,2%. Die Gene sind potentiell funktionell: Es liegen keine Stoppcodons im Leseraster vor und zudem entsprechen die regulatorischen Sequenzen (dc-, TATA-, und Hepta- und Nonamersequenzen; Ref.33-35) und die Spleißsequenzen (36) den jeweiligen Consensussequenzen.

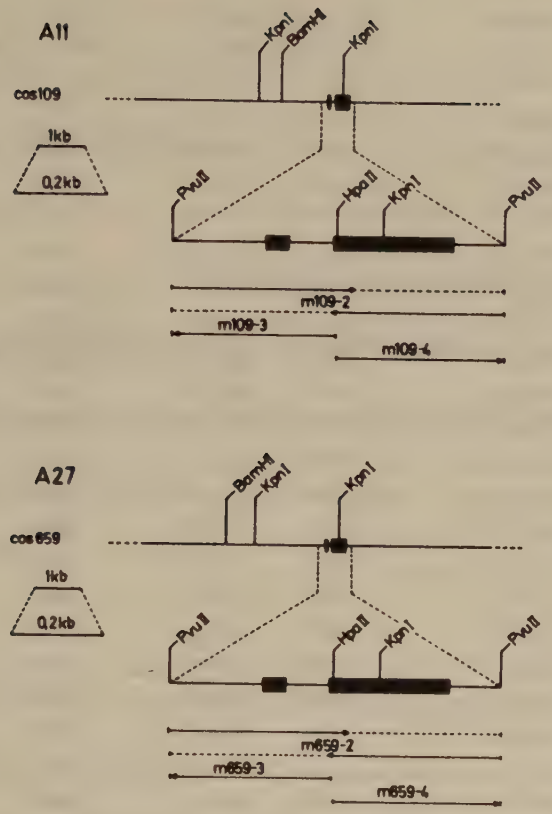


Abb.3: Sequenzierungsstrategie für die Gene A11 und A27

Die PvuII-Fragmente, auf denen die Gene A11 und A27 liegen, sind unterhalb der Restriktionskarten vergrößert dargestellt. Die Fragmente der Sequenzierungsklone sind durch Linien gekennzeichnet. Die Länge des sequenzierten Bereichs ist durch eine ausgezogene Linie angegeben, der nicht sequenzierte Bereich ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Pfeile markieren die Sequenzierungsrichtung.

Tabelle 2: Übersicht über die Sequenzierungsklone

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragments		Fragment-länge (bp)	Vektor
cos109	m109-2	PvuII	PvuII	700	mp10
	m109-3	PvuII	HpaII	350	mp10
	m109-4	HpaII	PvuII	350	mp10
cos115	m115-2	BamHI	BglII	840	mp11
	m115-5	BamHI	PstI	1200	mp10
	m115-7	HaeIII	BglII	270	mp11
	m115-8	HaeIII	HaeIII	360	mp11
	m115-9	PvuII	BglII	440	mp11
	m115-10	BamHI	PvuII	400	mp11
	m115-11	HaeIII	HaeIII	100	mp11
	m115-12	BamHI	HaeIII	90	mp11
	m115-13	BamHI	BamHI	2500	mp10
	m115-14	PstI	PstI	550	mp10
	m115-15	PstI	DraI	450	mp11
	m115-16	DraI	BamHI	800	mp11
	m115-17	PstI	BamHI	700	mp10
	m115-18	DraI	BamHI	1100	mp11
	m115-19	PstI	BamHI	1250	mp11
cos118	m118-8	BglII	BglII	2400	mp10
	m118-9	PstI	PstI	550	mp10
	m118-10	PstI	DraI	450	mp11
	m118-11	DraI	BglII	1200	mp11
	m118-12	PstI	BglII	1100	mp10
cos659	m659-2	PvuII	PvuII	700	mp11
	m659-3	PvuII	HpaII	350	mp10
	m659-4	HpaII	PvuII	350	mp10

Die Abkürzungen, die für die Klone verwendet wurden, sind im Abkürzungsverzeichnis (7.) aufgeführt.

Abb.4

A11

```
CTGCTTTGCATGTCCCTCCCAGCCGCCCTGCAGTCCAGAGCCCATATCAATGCCTGGGTCAGAGCTCTGGGGAGGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGA    -251

  | L
  |MetGluThrProAlaGlnLeuLeuPheLeuLeuLeuLeuTrpLeuProA                                                    -4
ACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGGTGAGGGGAACATGGGATGGTTTTGCATGTCAGTGAAAACCCTCTCAA    -151

GTCCTGTTACCTGGCAACTCTGCTGAATCAATACAATAATTAAAGCTCAATATAAAGCAATAATTCTGGCTCTTCTGGGAAGACAGTGGGTTTGATTTAG    -51

                                          | L'          | FR1
                                          |SerThrThrGlyGluIleValLeuThrGlnSerProAlaThrLeuSerLeuSerProGlyGl      17
ATTACATGGGTGACTTTTCTATTTTATTTCCAATCTCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA      50

                    | CDR1      27 A                          | FR2
uArgAlaThrLeuSerCysGlyAlaSerGlnSerValSerSerSerTyrLeuAlaTrpTyr GlnGlnLysProGlyLeuAlaProArgLeuLeuIleTyr      49
AAGAGCCACCCTCTCCTGCGGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC AGCAGAAAACCTGGCCTGGCGCCCAGGCTCCTCATCTAT     150

| CDR2                | FR3
AsnAlaSerSerArgAlaThrGlyIleProAsnArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerArgLeuGluProGluAspP      83
GATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT     250

                  | CDR3
heAlaValTyrTyrCysGlnGlnTyrGlySerSerPro                                                                  95
TTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCCCACAGTGATTCAGCTTGAAACAAAAACCTCTGCAAGACCTTCATTGTTTACTAGATTATA     350

CCAG                                                                                                    354
```

A27

```
CTGCTTTGCATGTCCCTCCCAGCCGCCCTGCAGTCCAGAGCCCATATCAATGCCTGGGTCAGAGCTCTGGGAGAAGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGA    -251

  | L
  |MetGluThrProAlaGlnLeuLeuPheLeuLeuLeuLeuTrpLeuProA                                                    -4
ACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGGTGAGGGGAACATGGGATGGTTTTGCATGTCAGTGAAAACCCTCTCAA    -151

GTCCTGTTACCTGGCAACTCTGCTCAGTCAATACAATAATTAAAGCTCAATATAAAGCAATAATTCTGGCTCTTCTGGGAAGACAATGGGTTTGATTTAG    -51

                                          | L'          | FR1
                                          |SerThrThrGlyGluIleValLeuThrGlnSerProGlyThrLeuSerLeuSerProGlyGl      17
ATTACATGGGTGACTTTTCTGTTTTATTTCCAATCTCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA      50

                    | CDR1      27 A                          | FR2
uArgAlaThrLeuSerCysArgAlaSerGlnSerValSerSerSerTyrLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnAlaProArgLeuLeuIleTyr      49
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT     150

| CDR2                | FR3
GlyAlaSerSerArgAlaThrGlyIleProAsnArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerArgLeuGluProGluAspP      83
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT     250

                  | CDR3
heAlaValTyrTyrCysGlnGlnTyrGlySerSerPro                                                                  95
TTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCCCACAGTGATTCAGCTTGAAACAAAAACCTCTGCAAGACCTTCATTGTTTACTAGATTATA     350

CCAG                                                                                                    354
```

Abb.4: Nukleinsäuresequenzen der duplizierten Gene A11 und A27 der A-Regionen des K-Locus

Die regulatorisch wichtigen dc- (33) und die TATA-Box-Sequenzen (34) sowie die V-J-Umlagerungssignalsequenzen (35) sind unterstrichen. Die Grenzen der codierenden Regionen wurden durch Vergleich mit veröffentlichen Aminosäure-Sequenzen (32) und unter Berücksichtigung der Exon-Intron-Spleißregeln (36) festgelegt. Die formalen Translationsprodukte sind über den Nukleotidsequenzen dargestellt. Die nach Kabat et al. invarianten Aminosäuren (32) sind unterstrichen. In den translatierten Bereichen wurden folgende Subfragmente gekennzeichnet: L, L'- Signalpeptid; FR1, 2, 3- "framework regions" und CDR1, 2, 3- "complementarity determing regions".

Durch Sequenzvergleich mit den beiden Keimbahn-V_KIII-Genen Humkv305 (37) und Humkv321 (38), die aus der Phagenbank von Lawn et al. (39) isoliert worden sind, konnte A. Meindl zeigen, daß die Paare A11/Humkv305 und A27/Humkv321 bis auf die Position -252 (Abb.4) identisch sind (40). Bei den Genen A11/A27 befinden sich an diesen Positionen zwei Guanosine, die entsprechenden Positionen bei den Genen Humkv305/Humkv321 weisen drei Guanosine auf. Es ist möglich, daß diese Sequenzunterschiede auf einem Lesefehler der Klenow-Polymerase beruhen.

Weitere Sequenzvergleiche mit umgelagerten Genen deuten darauf hin, daß sowohl A11 als auch A27 umgelagert werden. (37, 40): Der variable Teil des umgelagerten Gens EVJK11 (41) stammt möglicherweise von A11; die variablen Teile der umgelagerten Gene BL41 (42) und NG9 (43) stammen wahrscheinlich von A27. Der Vergleich von A11 und EVJK zeigte, daß die codierenden Bereiche und die Intronsequenzen dieser Gene vier Sequenzunterschiede aufweisen, die auf somatische Mutationen zurückgeführt werden könnten. Bei den Genen A27 und BL41 wurden im entsprechenden Bereich 18 Sequenzunterschiede gefunden. Da jedoch die Restriktionskarten stromaufwärts von den jeweiligen Signalpeptidsequenzen übereinstimmen, ist es möglich, daß die hohe Zahl der Unterschiede auf allelischen Varianten der Gene sowie auf somatischen Mutationen beruhen. Die Zahl der Sequenzunterschiede zwischen A27 und NG9 beträgt im Bereich von FR1 bis CDR3 drei, wobei zwei davon (AT in der A27-Sequenz; TA in der NG9-Sequenz) durch Lesefehler zustandegekommen sein können. Darüberhinaus wurde von Chen et al. (37)

gezeigt, daß Humkv305/A11 und Humkv321/A27 für den variablen Teil der Rheumafaktoren, die Antikörpermoleküle darstellen, codieren. Neuere Analysen von A. Meindl weisen jedoch darauf hin, daß der variable Teil des Rheumafaktors nur von A11 codiert wird (40).

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen der A11- und A27-Gene zeigen, daß beide Kopien der duplizierten Gene umgelagert werden und daß somit beide Kopien zur Vielfalt der Antikörper beitragen.

Chromosomale Lokalisierung. Die chromosomale Lokalisierung der A-Regionen wurde mit dem Subklon m163-1 (31) durchgeführt, der von B. Straubinger für die Extendierung der A-Regionen konstruiert wurde. Wie aus Abb.2 entnommen werden kann, liegt die Probe im inneren Bereich der Ab-Region. Da dieser Bereich bei beiden Duplikaten vorhanden ist, erkennt der Subklon m163-1 neben der Ab-Situation auch den entsprechenden Bereich der Aa-Region.

Der radioaktiv markierte Subklon m163-1 wurde zu den in Abschnitt 2.1.1.2. beschriebenen Hybridzell-DNAs hybridisiert. Als Hybridisierungskontrollen dienten Maus-, Hamster- und Human-DNA. Das Autoradiogramm der m163-1-Hybridisierung zeigt, daß zusätzlich zu der Humankontrolle all diejenigen Hybridzellinien ein Signal geben, die auch mit der C_K-Probe hybridisieren (2.1.1.2.). Darüberhinaus sind die relativen Intensitäten der Signale bei beiden Hybridisierungen gleich. Mit diesen Daten konnten daher die A-Regionen eindeutig dem Chromosom 2 zugeordnet werden.

2.2.2. Die L-Regionen

Zwei weitere V_K-Regionen, die sogenannten L-Regionen, wurden von M. Pech etabliert (44) und werden von E. Huber weiter bearbeitet (45). Diese Regionen weisen eine Länge von insgesamt 260 kb auf und enthalten 15 V_K-Gene der Subgruppen I, II und III. Wie die A-Regionen des K-Locus sind auch die L-Regionen dupliziert. Diese Duplikation wurde von M. Pech mit dem Subklon m21-1 nachgewiesen (44). Eine schematische Darstellung der L-Regionen ist in Abb.5 gegeben.

Abb.5: Schematische Darstellung der L-Regionen

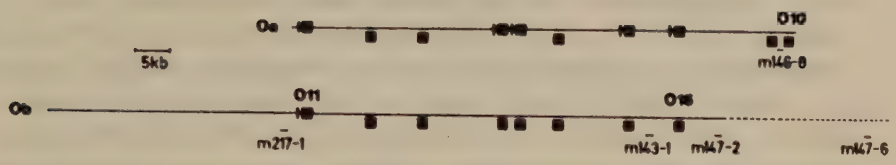
Abb.5: Die L-Regionen wurden von M. Pech (44) etabliert und werden von E. Huber (45) weiter bearbeitet. Die V_K-Gene und die Signalpeptidsequenzen sind durch Balken markiert. Die Lage des für die Lokalisierungsanalysen eingesetzten Klons m21-1 ist durch eine ausgezogene Linie angegeben. Die Bereiche, die der Klon zusätzlich zum Ausgangsfragment erkennt, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Für die chromosomale Lokalisierungsanalyse wurde derselbe Klon wie für die Duplikationsanalysen eingesetzt. Innerhalb der L-Regionen erkennt der Klon m21-1 vier verschiedene Bereiche. Mit Plazenta-DNA, die mit der Restriktionsnuklease EcoRI gespalten wurde, ergibt der Klon ein starkes und ein etwas schwächeres Hybridisierungsignal. Da die Cosmide der L-Regionen nicht mit EcoRI kartiert wurden, konnte nicht entschieden werden, ob beide oder nur eines der Signale zu den L-Regionen gehören. Die Lokalisierungsanalysen zeigten jedoch, daß beide Fragmente auf Chromosom 2 liegen. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, auf weitere Einzelheiten einzugehen.

2.2.3. Die O-Regionen

Die O-Regionen, die im wesentlichen von H.-D. Pohlenz und W. Pargent bearbeitet wurden, umfassen zwei genomische Abschnitte von je 140 kb und enthalten insgesamt 18 V_K-Gene der Subgruppen I, II und III (Abb.6; Ref.46, 47).

Abb.6: Übersicht über die O-Regionen



Die Abb.6 zeigt die O-Regionen, die von H.-D. Pohlenz und W. Pargent bearbeitet wurden (46, 47). Die V_K-Gene sind durch ausgefüllte Balken gekennzeichnet; bei sequenzierten Genen ist der Signalpeptidanteil jeweils gesondert dargestellt. Die Lagen der Klone, die für die chromosomalen Lokalisierungsanalysen eingesetzt wurden, sind durch ausgezogene Linien markiert. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Bereich, in dem ein Ligierungsartefakt vorliegt.

Im Verlauf der Strukturanalysen des menschlichen K-Locus wurden die Genkarten der O-Regionen in beide Richtungen extendiert. Dabei konnte kürzlich von W. Pargent und A. Meindl nachgewiesen werden, daß eine Gruppe von sieben Cosmidklonen die Ob-Region verlängern (40, 47). Weiter konnten W. Pargent und W. Lorenz durch Hybridisierungsexperimente und Restriktionskartenvergleiche zeigen, daß ein extendierendes Cosmid der A-Regionen mit den O-Regionen überlappt (47, 48). Bevor jedoch diese Extensionen von der Arbeitsgruppe festgestellt und bestätigt werden konnten, wurde die chromosomale Lage der einzelnen Regionen im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß diese Regionen auf Chromosom 2 liegen.

Lokalisierung einer Cosmidgruppe, die später den O-Regionen zugeordnet werden konnte. Beim Absuchen der Genbank III (4.1.3.) mit der V_K-II spezifischen Genprobe m607V-3 (30) wurden von B. Straubinger drei Cosmidklone isoliert und charakterisiert (49), die anhand der Restriktionskarten derselben genomischen Region zugeordnet werden konnten. Diese Region konnte im Verlauf der weiteren Strukturanalysen des K-Locus durch zusätzliche Cosmidklone extendiert werden. Zwei der vier Cosmidklone, cos215 und cos217, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit der von B. Straubinger

charakterisierten Cosmidgruppe zugeordnet.

Die chromosomale Lokalisierungsanalyse wurde mit dem Subklon m217-1 durchgeführt, der für diesen Zweck konstruiert wurde (Abb.6; Tabelle 3). Die Vorgehensweise war wie folgt: ein 1,2 kb langes HindIII-Fragment wurde aus dem Cosmidklon cos217 isoliert und in den M13 mp10-Vektor kloniert. Der daraus resultierende Subklon m217-1 ergibt mit EcoRI gespaltener Plazenta-DNA ein starkes und zwei sehr schwache Signale. Bei der Hybridisierung des Klons m217-1 zu den Hybridzellinien stellte sich heraus, daß die dazugehörende Region auf Chromosom 2 liegt. Einzelheiten dieser Lokalisierung können aus der Abb.7a entnommen werden, in der das Autoradiogramm der m217-1-Hybridisierung dargestellt ist.

Lokalisierungsanalysen der ursprünglichen O-Regionen. Die chromosomale Lokalisierung der O-Regionen wurde mit dem Subklon m143-1 durchgeführt, der von H.-D. Pohlenz für die Extension der O-Regionen erstellt wurde (Abb.6; Ref.46). Durch Hybridisierung des radioaktiv markierten Klons m143-1 zu den Hybridzellinien-DNAs konnten die O-Regionen eindeutig Chromosom 2 zugeordnet werden. Das Segregationsmuster sowie die Signalintensitäten auf dem dazugehörenden Autoradiogramm entsprechen demjenigen der C_K-Hybridisierung, die im Abschnitt 2.1.1.2. beschrieben ist.

Der Subklon m143-1 erkennt beide duplizierten O-Situationen, Oa und Ob. Die Homologie zwischen Oa und Ob bricht jedoch kurz nach dem m143-1-Bereich ab (Abb.6). Um zu klären, ob dieser Homologieabbruch echt ist oder ob in dieser Region ein Ligierungsartefakt vorliegt, wurde von W. Pargent der Subklon m146-8 konstruiert (47). Dieser Subklon liegt in der Oa-Region und erkennt aufgrund des Homologieabbruchs die entsprechende Situation in Ob nicht (Abb.6). Die Lokalisierungsanalyse zeigt, daß, trotz einiger Unstimmigkeiten mit der C_K-Hybridisierung, die Probe auf Chromosom 2 liegt. Im Gegensatz zu der C_K-Probe ergeben die Zelllinien HZ2 und HZ5 mit dem Fragment 146-8 keine erkennbaren Hybridisierungssignale. Das Fehlen der Signale kann dadurch erklärt

Abb.7a: Autoradiogramm der m217-1-Lokalisierung

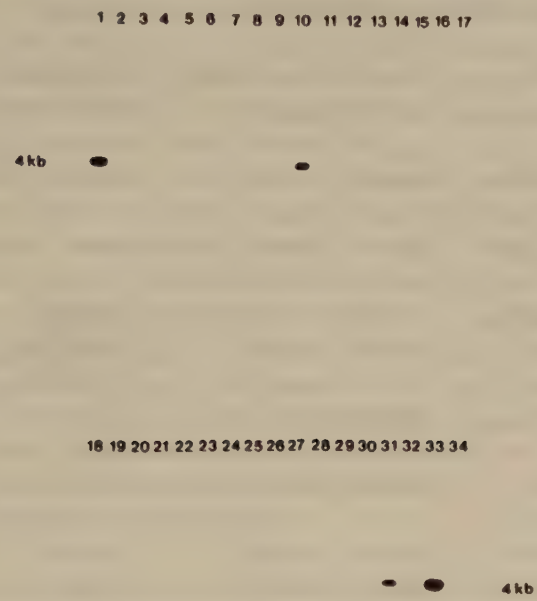


Abb.7: Autradiogramme der m217-1-, der m108-1-, der m115-20- und der m161-1-Lokalisierung

Die fortlaufende Nummerierung der Zellinien entspricht derjenigen in Abb.1, in der die Karyotypen dieser Zellinien schematisch dargestellt sind. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind angegeben.
Die Filter, die für die m217-1-, m115-20- und m161-1-Hybridisierungen benutzt wurden, wurden freundlicherweise von Professor K.-H. Grzeschik zur Verfügung gestellt. Die DNAs dieser Filter wurden mit der Restriktionsnuklease EcoRI gespalten und auf Pall-Membranen transferiert (4.2.2.). Das Filter für die m108-1-Hybridisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigt. Die DNAs der Zellinien, die ebenfalls von Professor K.-H. Grzeschik zur Verfügung gestellt wurden, wurden mit der Restriktionsnuklease BglII gespalten und auf GeneSreen-Filter transferiert (4.2.2.). Die Hybridisierung der Probe m108-1 wurde analog zu Ref.28 durchgeführt, die übrigen drei nach Ref.27.

Tabelle 3: Übersicht über die konstruierten Lokalisierungs- bzw. Extensionssuchklone

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragments		Fragment-länge (bp)	Vektor
cos108	m108-1	BglII	EcoRI	500	mp10
cos115	m115-20	BglII	ClaI	850	mp8
cos118	p118-6	HaeIII	HaeIII	300	pUC9
	m118-7	BglII	BglII	1400	mp10
cos217	m217-1	HindIII	HindIII	1200	mp11
cos219	m219-1	BglII	BglII	700	mp9
cos138	138-1	BglII	SmaI	1100	--
	138-2	SmaI	BglII	700	--
	m138-3	BglII	BglII	500	pUC9
	m138-4	XhoI	SphI	1400	mp19

Die Bezeichnungen der Klone sind im Abkürzungsverzeichnis (7.) erläutert. Striche in der Vektor-Spalte bedeuten, daß die entsprechenden Fragmente nicht subkloniert wurden.

werden, daß die spezifische Aktivität der Probe m146-8 geringer war als diejenige des C_K-Fragments, so daß die ohnehin schwachen Signale der Zellinien HZ2 und HZ5 (2.1.1.2.) nicht mehr identifizierbar waren. Zusätzlich zu den übrigen C_K-positiven Zellinien HZ10 und HZ31 hybridisiert die Probe m148-8 mit der Zellinie HZ32. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind allerdings im Vergleich zu denen der anderen positiven Zellinien unterschiedlich. Daher ist es möglich, daß diese zusätzlichen Signale artifiziell zustandegekommen sind.

Ein weiterer Subklon, der von H.-D. Pohlenz für die Untersuchung des Homologieabbruchs bei den O-Regionen konstruiert

wurde (46), konnte mit Hilfe der Lokalisierungsanalysen ebenfalls Chromosom 2 zugeordnet werden. Dieser Klon m147-2 liegt in der Ob-Region und erkennt die entsprechende Oa-Region nicht (Abb.6). Wie der Subklon m146-8 hybridisiert die Probe m147-2 nur mit den Zellinien HZ10 und HZ31. Im Gegensatz zum erstgenannten Klon m146-8 gibt die Probe m147-2 keine Signale mit der Zellinie HZ32. Diese Daten sprechen dafür, daß der Bereich des m147-2-Klons auf Chromosom 2 liegt. Der benachbarte Bereich jedoch konnte nicht auf Chromosom 2 lokalisiert werden. Dieser Befund wurde mit dem Klon m147-6 (Abb.6) nachgewiesen, der ursprünglich von W. Pargent für Extensionsversuche erstellt wurde (47). Bei der Hybridisierung dieses Klons zu den Hybridzell-DNAs ergeben die meisten Hybridzellinien ein Signal, bei der für die im K-Locus liegenden Proben diagnostischen Zellinie HZ10 fehlt es aber. Damit wurde deutlich, daß der Klon m147-6 nicht auf Chromosom 2 liegt. Es war jedoch mit den verfügbaren Daten nicht möglich, die chromosomale Lage des Bereichs festzulegen.

Die Lokalisierungsanalysen der O-Regionen zeigen, daß die Kernbereiche der O-Regionen auf Chromosom 2 liegen. Zudem ging aus den Analysen hervor, daß zwischen den Bereichen 147-2 und 147-6, die beide in der Ob-Situation lokalisiert sind, offensichtlich ein Ligierungsartefakt vorliegt, bei dem zwei verschiedene genomische Fragmente ligiert wurden.

2.2.4. Die W-Regionen

Die W-Regionen (Abb.8) stellen weitere V_K-Regionen dar, deren chromosomale Lage überprüft werden sollte. Im Gegensatz zu den A-, L- und O-Regionen kommen die W-Regionen nach Analysen von W. Lorenz mehr als zweimal im menschlichen Genom vor (48). Zudem unterscheiden sich die W-Regionen noch in weiteren Punkten von den A-, L- und O-Regionen. Alle bis jetzt sequenzierten V_K-Gene sind Pseudogene (46, 50). Ferner konnte F.-J. Zimmer nachweisen, daß die Wb-Situation eine inverse Duplikation enthält (46, 51).

Abb.8: Schematische Darstellung der W-Regionen

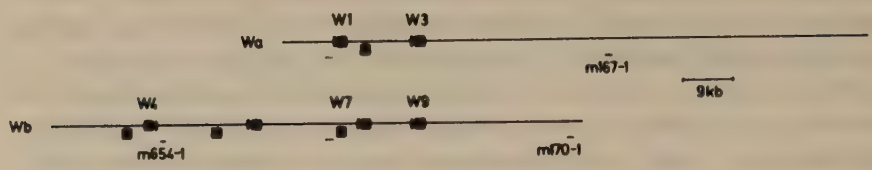


Abb.8: Die V_K-Gene sind durch ausgefüllte Balken markiert; bei sequenzierten Genen ist der Signalpeptidanteil jeweils gesondert angegeben. Die Lokalisierungsklone sind durch ausgezogene Linien gekennzeichnet. Der Klon m654-1 erkennt neben der Situation, von der er stammt, noch zwei weitere Bereiche, die in der Abb. durch gestrichelte Linien angegeben sind.

Die chromosomalen Lokalisierungsanalysen der W-Regionen wurden zunächst mit zwei verschiedenen Extensionssuchklonen durchgeführt. Der erste Subklon m167-1 wurde von H.-D. Pohlenz für die Extension in die 3'-Richtung konstruiert (46), die zweite Probe m654-1 wurde von F.-J. Zimmer angefertigt und für die Extension in die 5'-Richtung eingesetzt (51, Abb.8). Die Segregationsmuster der beiden Proben auf den Filtern, welche die transferierten DNAs der Hybridzellinien enthalten, entsprechen demjenigen der C_K-Hybridisierung. Wie bei den meisten anderen Proben, die Chromosom 2 zugeordnet werden konnten, geben die Hybridzellinien HZ2, HZ5, und HZ31 sehr schwache Signale. Die Zellinie HZ10 jedoch, die nach unseren Erfahrungen als diagnostisch für Chromosom 2 gilt, hybridisiert stark mit den beiden eingesetzten Proben. Mit diesen Daten konnten daher die Proben m167-1 und m654-1 auf Chromosom 2 lokalisiert werden.

Zusätzlich zu den Subklonen m167-1 und m654-1 wurde noch ein weiterer Klon aus der Wb-Situation auf seine chromosomale Lage hin getestet. Dieser Klon m170-1 wurde von F.-J. Zimmer für die Untersuchung des Homologieabbruchs zwischen der Wa- und Wb-Region konstruiert (51; Abb.8). Wie bei der C_K-Probe hybridisiert die Zellinie HZ10 am stärksten mit dem Fragment 170-1. Doch zusätz-

lich zu den Zellinien, die ebenfalls Signale mit der C_K-Probe geben, hybridisieren noch weitere Zellinien: HZ20, HZ28 und HZ30. Diese zusätzlichen Signale weisen darauf hin, daß die Probe m170-1 außer auf Chromosom 2 noch auf anderen Chromosomen homologe Bereiche besitzt. Es war jedoch nicht möglich, diese homologen Bereiche einem bestimmten Chromosom zuzuordnen.

Die oben beschriebenen Lokalisierungsdaten zeigen, daß die W-Regionen auf Chromosom 2 liegen. Wie aus der m170-1-Hybridisierung hervorgeht, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß bestimmte Teile der W-Regionen auf verschiedenen Chromosomen vorkommen.

2.2.5. Die cos108-Region

Die cos108-Region stellt einen genomischen Abschnitt dar, der nur durch einen Cosmidklon repräsentiert ist. Die Region wurde im wesentlichen von H. Smola und C. Huber kartiert und charakterisiert (52, 53). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden innere Bereiche des Cosmidklons weiter analysiert. Zudem wurde versucht, Subklone zu konstruieren, die für Lokalisierungs- und Extensionsanalysen eingesetzt werden sollten.

Weiterführende Analysen innerer Bereiche des Cosmidklons. Im allgemeinen lassen sich Restriktionsspaltstellen in unmittelbarer Nähe des Vektoranteils sicher kartieren. Dies ist mit Hilfe von Vektor internen Spaltstellen möglich, deren Positionen bekannt sind. Im Gegensatz dazu lassen sich Restriktionsspaltstellen, die im inneren Bereich des Cosmidklons liegen, in einzelnen Fällen nicht genau festlegen, ohne entsprechende Subklonierungen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden solche Bereiche des Cosmidklons cos108 isoliert und in den Vektor pBR322 kloniert. Der erste Klon p108-2, der in diesem Zusammenhang konstruiert wurde, enthält ein SmaI-BglII-Fragment von 9 kb, der zweite Klon p108-3 enthält ein 6 kb langes BglII-Fragment. Beide Klone dienten dazu, entweder

bereits kartierte Restriktionsspaltstellen zu bestätigen oder zu ergänzen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind zusammen mit den Kartierungsdaten von H. Smola und C. Huber in Abb.9 dargestellt.

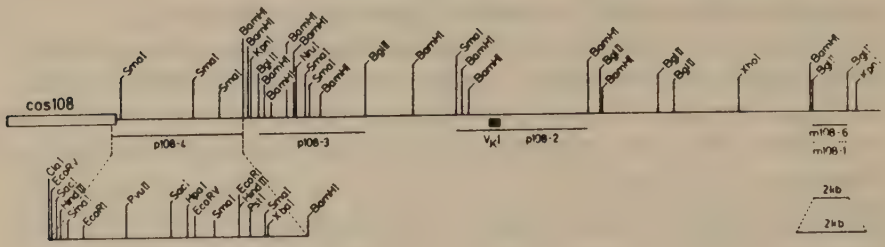


Abb.9: Restriktionskarte der cos108-Region

Die Region cos108 wurde im wesentlichen von H. Smola (52) und C. Huber (53) kartiert und charakterisiert. Die Bereiche, die in pBR322- und M13-Vektoren subkloniert wurden, sind durch Linien gekennzeichnet. Die Lage des Klons m108-1, der ein BglII-EcoRI-Fragment von 0,5 kb enthält, ist innerhalb des BglII-Fragments nicht genau festgelegt. Die beiden Möglichkeiten sind durch gestrichelte Linien markiert. Die Feinkartierung des Klons p108-4 wurde von B. Haas, Universität Tübingen, durchgeführt. Der Genbereich ist durch einen ausgefüllten Balken dargestellt, der Cosmidklon pHC79 ist durch einen offenen Balken gekennzeichnet. In einigen Versuchen wurden zusätzlich zum V_KI-Genbereich mit den folgenden Hybridisierungsproben schwache Signale beobachtet: die V_KII-Probe 607V-3 (30) hybridisiert mit dem Fragment des Subklons p108-3; die V_KIII-Probe m21-4 (11) gibt mit dem Fragment des Subklons p108-2 ein Hybridisierungssignal. Diese Signale wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Konstruktionsversuche von Lokalisierungs- und Extensionssuchklonen. Um die V_K-Gen-haltige Region des Cosmidklons cos108 in beide Richtungen zu extendieren, sollten Extensionssuchklone erstellt werden. Für die Verlängerung in die 5'-Richtung des Cosmidklons wurde zunächst ein ClaI-BamHI-Fragment von 7,5 kb isoliert und in den pBR322-Vektor kloniert. Die ClaI-Stelle ist identisch mit derjenigen des Cosmidvektors pHC79. Der Subklon p108-4, der aus dieser Klonierung entstand, wurde mit verschie-

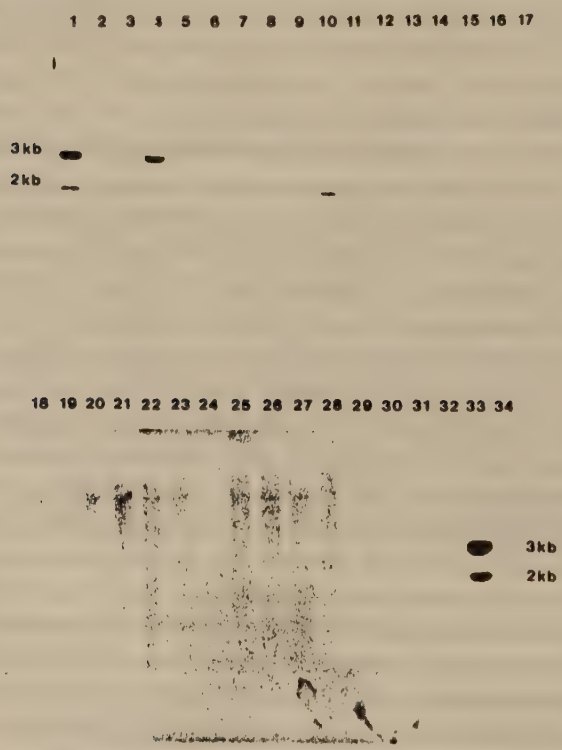
denen, häufig spaltenden Restriktionsnukleasen feinkartiert. Die Ergebnisse dieser Kartierung sind in Abb.9 dargestellt. Die Hybridisierung des entsprechenden Kartierungsfilters mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA zeigt, daß das klonierte Fragment nur zwei Subfragmente enthält (EcoRI-PvuII-Fragment von 1,2 kb; SacI-EcoRV-Fragment von 0,6 kb), die mit Plazenta-DNA nicht hybridisieren. Diese Fragmente erwiesen sich jedoch bei der weiteren Analyse als repetitiv, so daß sie für Extensionsexperimente nicht eingesetzt werden konnten.

Für die Lokalisierung sowie für die Extension in die 3'-Richtung der cos108-Region wurde der Subklon m108-1 konstruiert (Tabelle 3). Zu diesem Zweck wurde das terminale XhoI- SalI-Fragment von 8 kb isoliert und anschließend mit den Restriktionsnukleasen BglII und BamHI nachgespalten. Die SalI-Stelle ist identisch mit derjenigen des pHC79-Vektors. Die Subfragmente, die durch die Doppelspaltung entstanden, wurden im Vektor M13 mp10 kloniert. Aus diesem Ansatz wurde der Klon m108-6 erhalten, der ein 2 kb langes BglII-Fragment enthält. Da dieses Fragment mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA ein Signal gibt, wurde das klonierte Fragment mit der Restriktionsnuklease EcoRI nachgespalten, was dann schließlich zum Klon m108-1 führte. Dieser Klon enthält ein BglII-EcoRI-Fragment von 0,5 kb und ergibt mit EcoRI gespaltener Plazenta-DNA ein Hybridisierungssignal, mit BglII gespaltener Plazenta-DNA zwei. Das größere Fragment entspricht einer Länge von 3 kb, das kleinere Fragment weist eine Länge von 2 kb auf und konnte der cos108-Region zugeordent werden.

Der Klon m108-1 wurde sowohl für Extensionsversuche als auch für Lokalisierungsanalysen eingesetzt. Bis jetzt blieben jedoch alle Extensionsversuche der cos108-Region, die mit Hilfe der Probe m108-1 durchgeführt wurden, erfolglos. Es konnten keine Cosmide aus den Genbanken III, IVa und IVb (4.1.3.) isoliert werden, die homologe Bereiche zu dem Klon m108-1 aufwiesen. Der Grund dafür ist nicht bekannt. Im Gegensatz zu den Extensionsversuchen konnte die chromosomale Lokalisierung der cos108-Region mit Hilfe des Subklons m108-1 erfolgreich durchgeführt werden. Wie das Autoradiogramm der Lokalisierungsanalyse zeigt, können beide hybri-

disierenden Fragmente chromosomal zugeordnet werden: Das zur cos108-Region gehörende Fragment von 2 kb liegt auf Chromosom 2, das Fragment von 3 kb liegt auf Chromosom 9. Die stärkere Intensität des Signals auf Chromosom 9 im Vergleich zu derjenigen auf Chromosom 2 kann darauf zurückgeführt werden, daß Chromosom 9 mehr zur Probe m108-1 homologe Bereiche aufweist als Chromosom 2. Das Autoradiogramm der m108-1-Lokalisierung ist in Abb.7b dargestellt.

Abb.7b: Autoradiogramm der m108-1-Hybridisierung



Die Erläuterungen zum Autoradiogramm sind in der Legende zur Abb.7a-d auf Seite 23 gegeben.

2.3. V_K-Regionen, die sicher oder möglicherweise außerhalb des K-Locus liegen

2.3.1. Die Chr1-Region

Die Chr1-Region stellt einen genomischen Abschnitt dar, der ursprünglich durch sieben Cosmidklone charakterisiert wurde (54, Abb.10). Da mit keiner der von der Arbeitsgruppe etablierten V_K-Regionen eine Homologie bzw. eine Überlappung gefunden werden konnte, erschien es sinnvoll, die Chr1-Region zu extendieren, um einen möglichen Anschluß an eine andere V_K-Region zu erhalten. Zudem sollte mit Hilfe der Extension gezeigt werden, ob die benachbarten Regionen weitere V_K-Gene aufweisen.

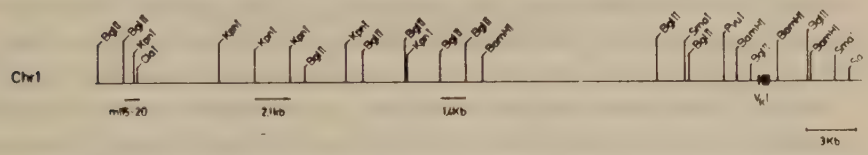


Abb.10: Restriktionskarte der Chr1-Region

Die Cosmide, aus denen die Karte der Chr1-Region ursprünglich konstruiert wurde, sind veröffentlicht (54, 56). Der Suchklon und die beiden diagnostischen Fragmente sind unterhalb der Restriktionskarte gezeigt.

Extendierung der Chr1-Region. Für die Extension in die 5'-Richtung der Chr1-Region wurde der Subklon m115-20 konstruiert (Abb.10; Tabelle 3). Dazu wurde ein 0,85 kb langes BglII-ClaI-Fragment, das mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA nicht hybridisiert, isoliert und im M13 mp8-Vektor kloniert. Mit Plazenta-DNA, die mit der Restriktionsnuklease EcoRI gespalten wurde, ergibt die radioaktiv markierte Prol . m115-20 eine Bande, mit BglII gespaltener Plazenta-DNA zwei.

Das Absuchen der Genbanken IVa und IVb (4.1.3.) mit der Probe m115-20 ergab insgesamt 20 Cosmidklone. Mit einer ersten Analyse dieser Klone konnte gezeigt werden, daß 15 von den 20 Isolaten mit dem Subklon m115-20 hybridisieren und zudem die richtige Fragmentgröße des hybridisierenden Bereichs im Vergleich zur Ausgangssituation aufweisen.

In einem weiteren Schritt wurde das mögliche Ausmaß der Chr1-Verlängerung durch die Extensionscosmide bestimmt. Das Prinzip dabei war, daß durch Restriktionsspaltung der isolierten Cosmidklone das Vorhandensein von zwei diagnostischen Fragmenten aus der ursprünglichen Chr1-Region analysiert wurde. Das eine diagnostische Fragment, ein KpnI-Spaltprodukt mit einer Länge von 2,1 kb, liegt 8 kb von dem Subklonbereich entfernt, das andere Fragment, ein 1,4 kb langes BglII-Fragment, weist zum Subklonbereich eine Distanz von ungefähr 20 kb auf (Abb.10).

Es stellte sich heraus, daß von den 15 Cosmidklonen elf beide diagnostischen Fragmente enthalten. Diese Cosmidklone überlappen somit über eine Strecke von mindestens 20 kb mit der Ausgangssituation. Von den restlichen vier Klonen weisen drei nur das KpnI-Fragment auf, bei einem Klon fehlen beide diagnostischen Bereiche. Diese Daten zeigen, daß der letztgenannte Klon die ursprüngliche Chr1-Region am weitesten extendieren kann. Dazu muss jedoch bemerkt werden, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Fehlen der diagnostischen Fragmente auf einem allelischen Polymorphismus beruht.

In einem weiteren Schritt wurde geprüft, ob die extendierte Chr1-Region zusätzliche V_K-Gene enthält. Zu diesem Zweck wurden die Extensionscosmide mit den für die Subgruppen I, II und III spezifischen V_K-Proben hybridisiert: m1-3 (29), m607V-3 (30) und m21-4 (11). Bei keinem der Extensionscosmide konnten jedoch Hybridisierungssignale identifiziert werden. Damit wurde klar, daß die extendierte Chr1-Region keine weiteren V_K-Gene aufweist.

Lokalisierung der Chr1-Region. Da sich die Chr1-Region hinsichtlich der Genzahl so deutlich von den meisten anderen V_K-Regionen unterscheidet, wurde vor weiteren Untersuchungen der Extensionscosmide die chromosomale Lage der Chr1-Region festgestellt. Dazu

wurde der oben beschriebene Subklon m115-20 zu den Hybridzelllinien-DNAs hybridisiert. Das Segregationsmuster dieser Hybridisierung zeigt, daß die Chr1-Region nicht auf demselben Chromosom liegt wie das C_K-Gensegment, sondern auf Chromosom 1 (Abb.7c).

Abb.7c: Autoradiogramm der m115-20-Lokalisierung

Die Erläuterungen zum Autoradiogramm sind in der Legende zur Abb.7a-d auf Seite 23 gegeben.

Zusätzlich zu den Hybridzellinien, die das Chromosom 1 enthalten, geben die Zellinien HZ26 und HZ27 ebenfalls je ein Signal. Diese Signale lassen sich so erklären, daß die beiden Zellinien Chromosom 1-Bruchstücke aufweisen, die mit den verwendeten biochemischen und zytologischen Methoden nicht identifiziert werden konnten (K.-H. Grzeschik, persönliche Mitteilung). Die genauere

chromosomale Lage der Chr1-Region wurde mittels einer zweiten Hybridisierung festgelegt. Die Hybridzellinien, die dazu verwendet wurden, enthalten Chromosom 1-Translokationen oder Chromosom 1-Deletionen. Einzelheiten zu diesen Hybridzellinien sowie zu der entsprechenden Hybridisierung sind in der Legende zur Abb.1 aufgeführt. Die zusätzliche Analyse der Chr1-Region erlaubte eine Zuordnung dieses DNA-Abschnitts auf Chromosom 1 zwischen 1p13 und 1q12.

Mit der Lokalisierung der Chr1-Region auf Chromosom 1 konnte zum erstenmal ein V_K-Gen außerhalb des K-Locus nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den transponierten Histon- und rRNA-Genen (16) werden im folgenden Text die dislozierten Gene Orphons genannt.

2.3.2. Die Chr22-Region

Die Chr22-Region (Abb.11) umfaßt einen genomischen Abschnitt von ungefähr 115 kb und enthält fünf V_K-Gene. Diese Region, die im wesentlichen von H.G. Bauer und F.-J. Zimmer bearbeitet wurde (51, 55), überlappt mit keiner der von der Arbeitsgruppe etablierten V_K-Regionen. Im Hinblick auf mögliche Orphons wurde daher die Region vor weiterführenden Analysen chromosomal lokalisiert.

Abb.11: Schematische Darstellung der Chr22-Region

Die V_K-Gene der Chr22-Region, die alle sequenziert worden sind (56, 58, 61), sind durch ausgefüllte Kästchen dargestellt, der Signalpeptidanteil ist jeweils gesondert markiert. Die Klone, die für die Lokalisierungsanalysen eingesetzt wurden, sind durch Linien gekennzeichnet.

Für die Lokalisierungsanalysen wurde der Subklon m119-2 eingesetzt, der von H.G. Bauer für Extensionsexperimente erstellt wurde (55, 56). Die Daten der entsprechenden Hybridisierung zeigen, daß der Klon m119-2 auf Chromosom 22 liegt. Alle Hybridzellinien, die das Chromosom 22 enthalten, ergeben bis auf zwei Ausnahmen ein Signal mit der Probe. Das Fehlen der Signale bei den beiden Chromosom 22-haltigen Hybridzellinien HZ7 und HZ16 kann folgendermaßen erklärt werden: Im allgemeinen wird das Vorhandensein von Chromosomen mit biochemischen und zytogenetischen Methoden sowie mit Hybridisierung von DNA-Proben, deren chromosomale Lokalisierung bekannt ist, nachgewiesen. Die Identifizierung des Chromosoms 22 bei den verwendeten Hybridzellinien beruhte nur auf zytogenetischen Analysen. Aus diesem Grund ist es möglich, daß bestimmte Chromosom 22-Fragmente, die auf einem anderen Chromosom in translozierter Form vorliegen, als Chromosom 22 registriert werden können (persönliche Mitteilung von K.-H. Grzeschik).

Um ein Ligierungsartefakt der Chr22-Region auszuschließen, wurde ein weiterer Subklon m120-12 auf seine chromosomale Lage hin überprüft. Dieser Subklon, der eine 5'-Flanke eines V_K-Gens darstellt (Abb.11), wurde von H. G. Bauer für die Charakterisierung des allelischen Restriktionsspaltstellen-Polymorphismus (RFLP) konstruiert (55). In den Lokalisierungsanalysen hybridisiert der Klon m120-12 mit den gleichen Hybridzellinien wie die Probe m119-2, doch die für Chromosom 2 diagnostische Zellinie HZ10 ergibt ein zusätzliches Signal.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl der Klon m120-12 als auch der Klon m119-2 auf Chromosom 22 liegen. Im Gegensatz zur m119-2-Probe weist der Klon m120-12 weitere homologe Bereiche auf Chromosom 2 auf. Da die letztgenannte Probe eine 5'-Flanke eines V_KIII-Gens darstellt, ist es möglich, daß das zusätzliche Signal auf Chromosom 2 aufgrund der 5'-Flankenhomologie mit weiteren V_K-Genen des K-Locus zustandekommt.

2.3.3. Die cos118-Region

Eine weitere Region, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurde, ist die cos118-Region (Abb.12). Diese Region wird durch einen Cosmidklon dargestellt und enthält ein einzelnes V_K-Gen der Subgruppe I. Da die Region mit keinem anderen V_K-Bereich überlappt, sollte die Region extendiert werden, um dadurch möglicherweise einen Anschluß an eine andere V_K-Region zu erhalten.

Abb.12: Restriktionskarte der cos118-Region

Die Kartierungsanalysen wurden von B. Straubinger durchgeführt (49). Das V_KI-Gensegment ist durch einen ausgefüllten Balken markiert; die Subklone m118-7 und p118-6 sind durch Linien unterhalb der Karte gekennzeichnet. Das artifizielle Vektorfragment sowie der pHC79-Vektor sind durch offene Balken dargestellt. Die Orientierungen der beiden artifiziell ligierten Subfragmente sind durch Pfeile angegeben. Der senkrechte Strich kennzeichnet den Ort der artifiziellen Ligierung. Die Zahlen hinter den Restriktionsspaltstellen entsprechen den Koordinaten des pHC79-Plasmids.

Extendierung der cos118-Region. Mit Hilfe des Klons m118-7 (Abb.12, Tabelle 3) wurde die Genbank III (4.1.3.) nach Extensionscosmiden für die cos118-Region abgesucht. Dabei konnten 15 Cosmidklone isoliert werden, die alle mit dem Subklon m118-7 ein Hybridisierungssignal ergeben. Doch im Gegensatz zu den Chr1-Extensionscosmiden weisen nur vier der 15 Cosmidklone die richtige Größe des hybridisierenden Fragments auf. Bei allen anderen entspricht der hybridisierende Bereich nicht der Ausgangssituation.

In einem weiteren Schritt wurde geprüft, ob die Extensionscosmide der cos118-Region zusätzliche V_K-Gene enthalten. Wie bei der Chr1-Region konnten auch hier keine weiteren V_K-Gene identifiziert werden.

Lokalisierung der cos118-Region. Die Lokalisierung der cos118-Region wurde mit demselben Subklon durchgeführt, der auch für die Extensionsversuche eingesetzt wurde. Obwohl diese Probe mehr als einmal im Humangenom vorkommt, konnte der Bereich des Klons m118-7 mit Hilfe der Hybridzellinien-DNAs dem Chromosom 15 zugeordnet werden, da alle Bereiche, die von der Probe erkannt werden, auf Chromosom 15 liegen. In Übereinstimmung mit der chromosomalen Lage der cos118-Region wurde diese Region ursprünglich Chr15-Region genannt (56). Da diese Region nur durch einen Cosmidklon repräsentiert wird und somit Ligierungsartefakt-verdächtig war, wurde die chromosomale Zuordnung in weiteren Versuchen überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß zwischen dem Subklon m118-7 und dem V_K-Genbereich ein Vektorfragment liegt. Deshalb mußte davon ausgegangen werden, daß der Subklon und das V_K-Gen nicht derselben genomischen Region angehören. Um die Genregion dennoch zu lokalisieren, wurde ein weiterer Klon aus der unmittelbaren Genregion konstruiert. Zu diesem Zweck wurde ein 6 kb langes BamHI-Fragment isoliert und mit der Restriktionsnuklease HaeIII nachgespalten. Die Spaltprodukte wurden im Vektor pUC9 kloniert. Der aus diesem Ansatz konstruierte Klon p118-6 (Abb.12; Tabelle 3) erkennt auf einem Plazenta-DNA-Filter zwei verschiedene BglII-Fragmente, die eine Länge von ungefähr 15 kb bzw. 20 kb aufweisen. Welches der beiden Fragmente der cos118-Region entspricht, kann mit den verfügbaren Daten nicht festgelegt werden, da zwischen der Probe p118-6 und dem Cosmidvektor außer einer SmaI-Stelle keine weiteren Restriktionsspaltstellen kartiert wurden (Abb.12). Aus dem Autoradiogramm der p118-6-Lokalisierung geht jedoch hervor, daß keines der BglII-Fragmente auf Chromosom 2 liegt. Das größere hybridisiernde Fragment weisen die Zellinien HZ3 und HZ24 auf, das kleinere Fragment konnte bei den folgenden Zellinien identifiziert werden: HZ3, HZ6, HZ9, HZ14, HZ18, HZ22, HZ24, HZ29, HZ30 und HZ31. Außer diesen Zellinien gibt die Zell-

linie HZ32 ein weiteres Signal, die Größe des hybridisierenden Fragments ist jedoch im Vergleich zur Humankontrolle unterschiedlich.

Die Signale der 118-6-Hybridisierung lassen eine genaue Lokalisierung des V_K-Gens der cos118-Region nicht zu. Mit den erhaltenen Daten kann aber die Aussage getroffen werden, daß der Genbereich der cos118-Region weder auf Chromosom 2 noch auf Chromosom 15 liegt. Somit stellt das V_K-Gen der cos118-Region ein weiteres V_K-Orphongen dar.

Ligierungsartefakt der cos118-Region. Bei der Konstruktion von Cosmidgenbanken ist es möglich, daß in einzelnen Fällen Ligierungsartefakte zustandekommen. Solche artifiziellen Ligierungsprodukte können dadurch entstehen, daß zwei verschiedene genomische Fragmente ligiert werden. Das daraus resultierende rekombinante Cosmid repräsentiert somit einen artifiziellen genomischen Bereich, der in der gleichen Sequenzabfolge im Genom nicht vorkommt. Weiter ist es möglich, daß artifizielle Cosmidklone zusätzliche Cosmidvektorfragmente enthalten, die entweder bei der Konstruktion der Genbank oder durch Rekombinationsereignisse in E. coli-Zellen entstanden sein können.

Hybridisierungsexperimente mit radioaktiv markierter pHC79-DNA haben gezeigt, daß der Cosmidklon cos118 neben dem pHC79-Vektor ein zusätzliches pHC79-Fragment enthält. Von diesem artifiziellen Vektorfragment wurden 300 Nukleotide im Bereich der Sau3A und HindIII-Restriktionsspaltstellen (Abb.12) sequenziert. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich identisch ist mit den entsprechenden Sequenzen des pHC79-Vektors. Zudem ging aus den Restriktionsanalysen des artifiziellen Vektorfragments hervor, daß dieses seinerseits aus zwei Subfragmenten besteht, die Kopf-an-Kopf ligiert wurden (Abb.12). Durch welche Mechanismen das Artefakt zustandegekommen ist, ist nicht klar. Da jedoch die benachbarten Bereiche des artifiziellen Vektorfragments von zwei verschiedenen genomischen Regionen stammen, muß sich das Artefakt während der Konstruktion der Genbank gebildet haben. Es ist möglich, daß der rechte Teil des artifiziellen Vektorfragments im Bereich der HindIII- und Sau3A-Spaltstellen (Abb.12) das ClaI-

BamHI-Fragment darstellt, das bei der Präparation der Vektorarme anfällt und bei der Konstruktion der Genbank nicht abgetrennt wurde (54).

2.3.4. Die cos138-Region

Die cos138-Region wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert (Abb.13). Die Region weist ein V_K-Gen der Subgruppe III auf und wird durch einen Cosmidklon dargestellt.

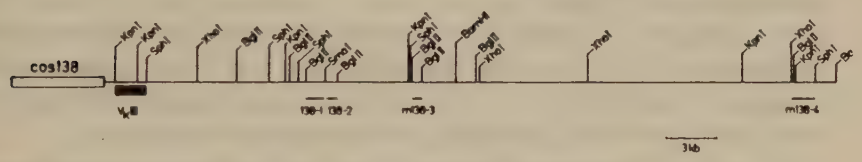


Abb.13: Restriktionskarte der cos 138-Region

Der Cosmidklon cos138 wurde von H. G. Bauer mit Hilfe der V_KIII spezifischen Proben m41V-7 und m21-4 isoliert (73). Die XhoI- und KpnI-Restriktionsspaltstellen des Cosmidklons wurden von C. Huber kartiert (53), die übrigen Spaltstellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgelegt. Das V_KIII-Gensegment ist durch ein ausgefülltes Kästchen dargestellt. Die Fragmente, die für die Lokalisierungsversuche isoliert wurden, sind unterhalb der Restriktionskarte gezeigt.

Für die chromosomale Lokalisierungsanalyse der cos138-Region wurden verschiedene Klone konstruiert (m138-1 bis 4; Abb.13; Tabelle 3), die sich jedoch bei der genaueren Analyse als repetitiv erwiesen und somit für die Lokalisierungsanalysen nicht eingesetzt werden konnten.

Als einzige der von der Arbeitsgruppe von Professor Zachau analysierten V_K-Regionen hybridisiert die cos138-Region mit der Minisatellitenprobe 15.1.11.4. Wie A. J. Jeffreys zeigen konnte,

erkennt diese Probe im Humangenom verschiedene Loci, die zwischen einzelnen Individuen stark polymorph sind (57). Ob dieser Befund für die cos138-Region eine Bedeutung hat, ist noch nicht klar.

2.3.4. Die cos219-Region

Eine weitere V_K-Region mit einem einzelnen V_KII-Gen wird durch den Cosmidklon cos219 dargestellt (49). Da diese Region keiner anderen V_K-Region zugeordnet werden konnte, wurde sie vor weiterführenden Analysen chromosomal lokalisiert. Dazu wurde der Subklon m219-1 konstruiert (Tabelle 3), der ein 0,7 kb langes BglII-Fragment enthält.

Die Lokalisierungsanalysen zeigen, daß die Probe m219-1 auf Chromosom 5 liegt. Alle Hybridzellinien, die das vollständige Chromosom 5 enthalten (HZ3, HZ4, HZ5, HZ6, HZ7, HZ9, HZ21, HZ27, HZ28, HZ29 und HZ30), ergeben ein Hybridisierungssignal.

Aus weiterführenden Analysen, die von T. Klopstock durchgeführt wurden, geht hervor, daß das Gen der cos219-Region identisch ist mit dem W1-Gen der W-Regionen. Zudem konnte durch Hybridisierungsexperimente gezeigt werden, daß auch die benachbarten Sequenzen des Gens mit dem entsprechenden Bereich der W-Regionen übereinstimmen (58). Bei den Lokalisierungsanalysen der W-Regionen wurde dieser Bereich, aus dem der Klon m654-1 (2.2.4.) stammt, dem Chromosom 2 zugeordnet. Damit wurde klar, daß bei der cos 219-Region wie bei der cos118-Region ein Ligierungsartefakt vorliegt. Im Gegensatz zur cos118-Region weist der Cosmidklon cos219 kein zusätzliches Vektorfragment auf.

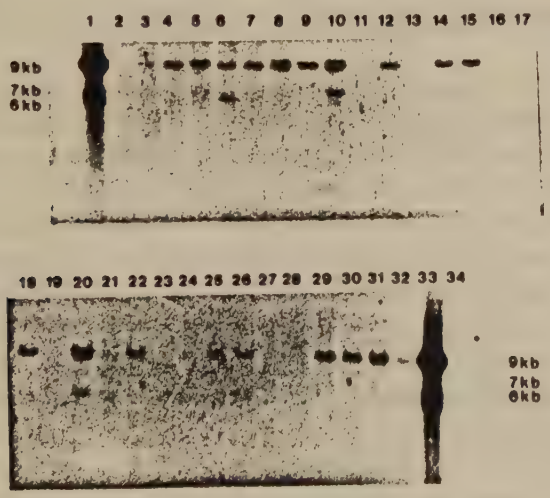
2.3.5. Die Z-Familie

Die Z-Regionen, die von B.Straubinger etabliert und bearbeitet wurden, stellen eine Familie mit mehreren verwandten Mitgliedern dar (59). Jedes Mitglied der Familie enthält ein V_K-Gen der Subgruppe I. Weiter weisen die Z-Regionen über weite Flankenab-

schnitte hinweg deutliche Homologien auf, so daß es bis jetzt nicht möglich war, für die einzelnen Mitglieder der Z-Familie spezifische Subklone zu konstruieren.

Der Subklon m161-1 wurde von B. Straubinger als Extensionssuchklon konstruiert (59). Dieser Subklon erkennt neben der Z4-Situation, aus der er stammt, noch weitere Mitglieder der Z-Familie. Zudem gibt er mit EcoRI-gespaltener Plazenta-DNA drei Signale, die Fragmenten unterschiedlicher Größen entsprechen. Bei der Hybridisierung zu den DNAs der Hybridzellinien stellte sich heraus, daß die Mitglieder der Z-Familie auf verschiedenen Chromosomen vorkommen. Zwei der drei Hybridisierungssignale konnten keinem bestimmten Chromosom zugeordnet werden; das Segregationsmuster des dritten hybridisierenden Fragments deutet auf eine Lokalisierung auf Chromosom 2 hin. Doch keine bis jetzt gefundene Situation der Z-Familie weist ein entsprechendes Fragment derselben Länge auf. Das Autoradiogramm der m161-1-Hybridisierung ist in Abb.7d dargestellt.

Abb.7d: Autoradiogramm der m161-1-Lokalisierung



Die Erläuterungen zum Autoradiogramm sind in der Legende zur Abb.7a-d auf Seite 23 gegeben.

2.4. Struktur einiger transponierter V_K-Regionen

Bei der Analyse der Orphonregionen stellte sich heraus, daß die Genbereiche einiger transponierter V_K-Gene stark konservierte 5'- und 3'-Flanken aufweisen, welche auf die Möglichkeit eines gemeinsamen Vorläufergens hindeuten. Um diesen Aspekt weiter zu verfolgen, wurden zwei dieser Gene sequenziert und mit weiteren Sequenzen transponierter V_K-Gene verglichen. Darüberhinaus wurden im Hinblick auf einen möglichen Amplifikationsmechanismus mehrere Fragmente aus dem konservierten Genbereich der Chr1-Region auf Replikationsaktivität hin analysiert.

2.4.1. Sequenzanalyse zweier transponierter V_KI-Gene aus der Chr1- und der cos118-Region

2.4.1.1. Kartierung und Subklonierung der Genbereiche

V_KI-Gen der Chr1-Region. Für die Sequenzanalyse des V_K-Gens der Chr1-Region (Abb.10) wurde zunächst ein 2,5 kb langes BamHI-Fragment, auf dem der Genbereich liegt, isoliert und im M13 mp10-Vektor kloniert. Der daraus resultierende Klon m115-13 diente zur genauen Lokalisierung des Genbereichs innerhalb des BamHI-Fragments. Zu diesem Zweck wurde das subklonierte Fragment mit den Restriktionsnukleasen BglII, DraI und PstI gespalten. Die Spaltprodukte aus den Einzel- und Doppelspaltungen wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine GeneScreen-Membran (4.2.2.) transferiert. Zur Festlegung der genauen Lage des Genbereichs wurde die Membran mit der V_KI-spezifischen Probe m1-3 (29) hybridisiert.

Nach der Erstellung der Feinkartierung des Genbereichs wurden die Sequenzierungsklone konstruiert. Dabei wurden folgende Punkte beachtet: Um die Fehlerrate bei der Sequenzierung auf ein Minimum zu beschränken, ist es notwendig, Strang und Gegenstrang zu se-

quenzieren. Darüberhinaus wurde über alle Spaltstellen hinweg sequenziert. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, daß die Sequenz von kleinen Restriktionsfragmenten verloren geht.

Die zur Sequenzierung des V_K-Gens der Chr1-Region geeigneten Fragmente wurden isoliert und in die entsprechenden M13-Vektoren kloniert. Die Sequenzstrategie des V_K-Gens ist aus Abb.14 zu ersehen, die genauen Daten der Sequenzierungsklone sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Abb.14: Sequenzierungsstrategie für die V_KI-Gene der Chr1- und cos118-Region

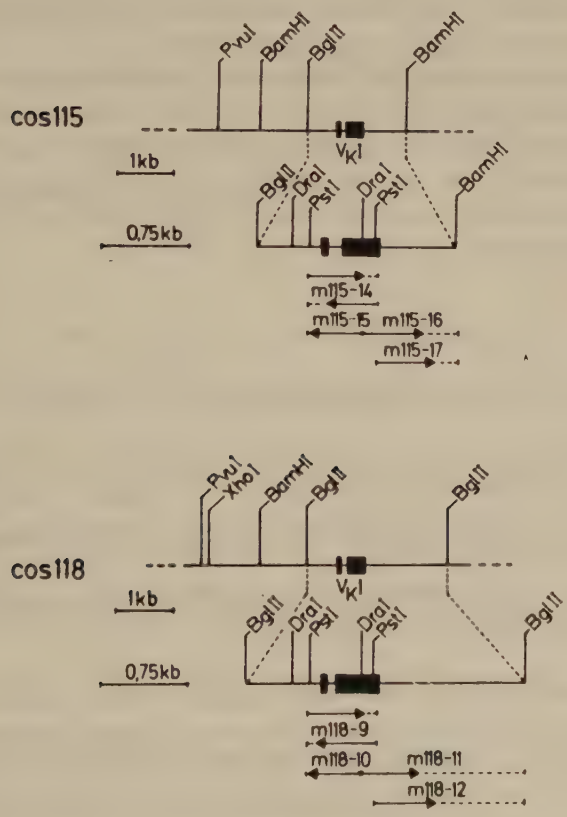


Abb.14: Die Abb. zeigt den feinkartierten Bereich des Gensegments der Chr1- bzw. der cos118-Region. Die Signalpeptidsequenzen und die codierenden Bereiche der Gensegmente sind durch ausgefüllte Balken dargestellt. Die Sequenzierungsklone sind unterhalb der jeweiligen Feinkartierungen angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Sequenzierungsrichtung. Die ausgezogenen Linien markieren die sequenzierten Bereiche; die gestrichelten Linien geben die gesamte Länge des subklonierten Fragments an.

V_K-Gen der cos118-Region. Bei der Erstellung der Sequenzierungsklone des Gens der cos118-Region (Abb.14) wurde das gleiche Prinzip angewendet wie bei der Sequenzanalyse des Gens der Chr1-Region. Zunächst wurde der Genbereich, ein 2,4 kb langes BglII-Fragment, isoliert und in den M13 mp10-Vektor kloniert. Der daraus entstandene Klon wurde zur weiteren Eingrenzung des Genbereichs benutzt. Dazu wurde das Gen-haltige Fragment mit den Restriktionsnukleasen PstI und DraI nachgespalten. Die Spaltprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf ein Gene-Screen-Filter transferiert. Durch Hybridisierung mit der V_KI-spezifischen Probe m1-3 (29) wurde die genaue Lage des Strukturgens bestimmt, die für die Planung und Erstellung der Sequenzierungsklone benötigt wurde. Die Daten dieser Klone sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2.4.1.2. Sequenzen der V_KI-Gene

Die Sequenzierungsklone der Gene der Chr1- und cos118-Region wurden nach der "Didesoxy-Kettenabbruch-Methode" sequenziert (60). Mit dieser Methode ist es möglich, mit einem 40 cm langen 6%-igen Acrylamidgel zwischen 300 und 350 Nukleotide zu sequenzieren. Die dabei erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe verschiedener Computerprogramme ausgewertet (4.2.12).

Sequenz des V_KI-Gens der Chr1-Region. In Abb.15a ist die Nukleotidsequenz des Gens zusammen mit dem formalen Translationsprodukt dargestellt. Da das Gen der Chr1-Region nicht auf demselben Chromosom liegt wie das C_K-Gensegment (2.3.1.) und somit nach den

Abb.15: Nukleinsäuresequenz der V_KI-Gene der Chr1- und der cos118-Region

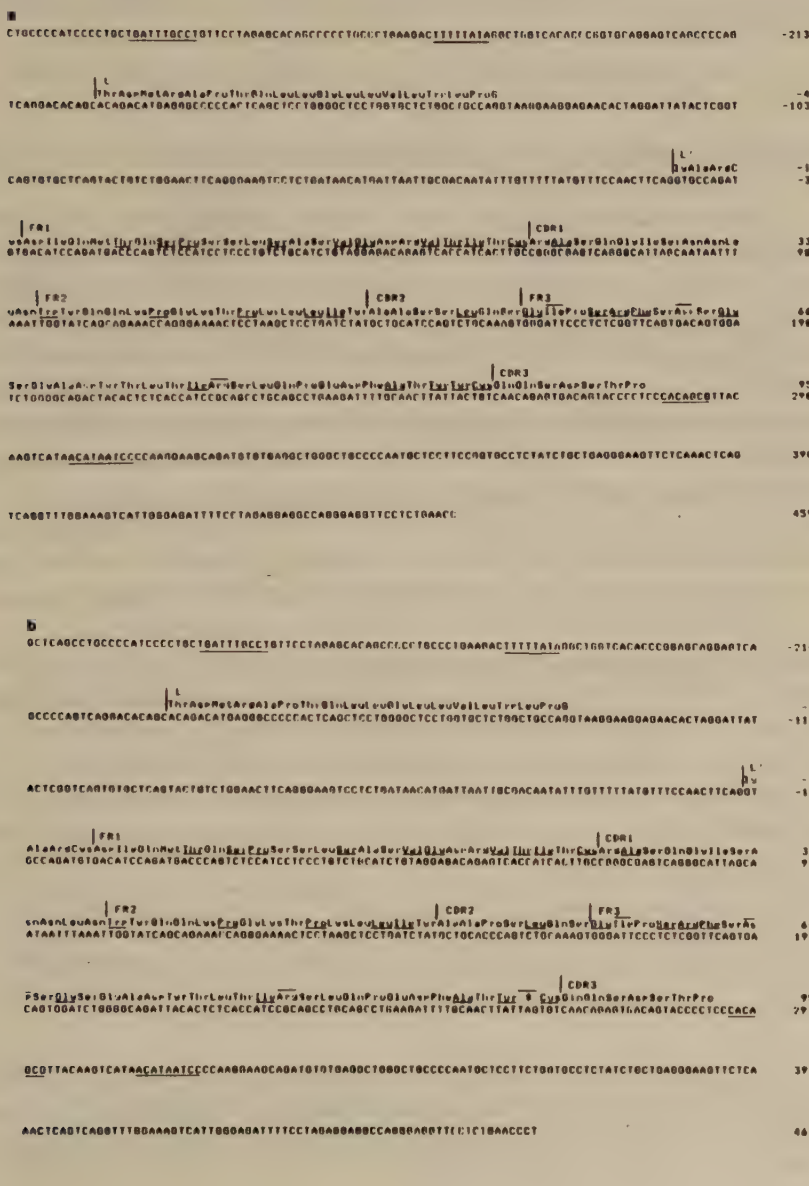


Abb.15: In (a) ist die Nukleotidsequenz des Gens der Chr1-Region und in (b) diejenige des Gens der cos118-Region abgebildet. Die formalen Translationsprodukte der Gene sind ebenfalls gezeigt. Eine Linie über einer Aminosäure bedeutet, daß eine invariante Aminosäure durch eine andere ersetzt ist. Die Markierung der übrigen charakteristischen Bereiche der V_K-Gene entspricht derjenigen von Abb.4. Die Erläuterung dazu ist in der Legende zu dieser Abb. gegeben.

Umlagerungsmodellen nicht umgelagert werden kann, muß das V_K-Gen der Chr1-Region als Pseudogen betrachtet werden.

Aus den Sequenzdaten ist ersichtlich, daß das übliche Startcodon ATG zu ACA mutiert ist. Diese Mutation kann jedoch durch das dritte Codon der Signalpeptidsequenz (Codon ATG) kompensiert werden. Darüberhinaus sind im FR3 drei invariante Aminosäuren, d.h. Aminosäuren, die mit mindestens 95% Wahrscheinlichkeit an bestimmten Positionen des Proteins vorkommen (32), ausgetauscht. Die regulatorischen Sequenzen auf der 5'- und 3'-Seite des Strukturgens (dc- (33), TATA- (34), Hepta- und Nonanukleotid-Sequenzen (35)) entsprechen mit Ausnahme der Heptanukleotid-Sequenz den jeweiligen Consensussequenzen. Bei der letztgenannten Sequenz unterscheidet sich im Vergleich zur Consensussequenz die Position 6. Hier ist das Nukleotid T durch das Nukleotid C ausgetauscht.

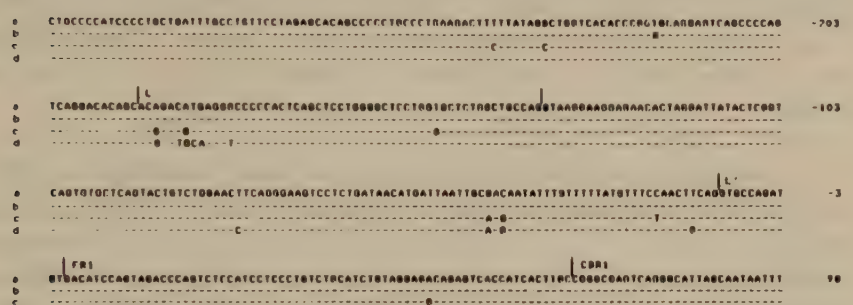
Sequenz des V_KI-Gens der cos118-Region. Abb.15b zeigt die DNA-Sequenz zusammen mit dem formalen Translationsprodukt des Gens der cos118-Region. Wie beim Gen der Chr1-Region handelt es sich auch hier, aufgrund der chromosomalen Lage um ein Pseudogen. Zusätzlich zu den Mutationen, die mit denjenigen des Gens der Chr1-Region identisch sind, weist die codierende Sequenz im FR3 das Stoppcodon TAG auf.

2.4.2. Sequenzvergleich transponierter V_KI-Gene

Die Sequenzvergleiche (Abb.16) wurden mit den V_K-Genen der Chr1-, der cos118- und der ZI-Region durchgeführt. Zusätzlich dazu wurde das V_KI-Gen Chr22-5 der Chr22-Region, das ebenfalls die konser-

vierten 5'-und 3'-Flanken aufweist, in den Sequenzvergleich mit einbezogen. Dieses Gen wurde von H.R. Jaenichen sequenziert (61), die Sequenzanalyse des Gens der ZI-Region wurde von R. Thiebe durchgeführt (59).

Abb.16: Sequenzvergleich einiger transponierter V_K-Gene



In (a) und (b) sind die Sequenzen der Gene der Chr1- bzw. der cos118-Region (Abb.15) und in (c) und (d) diejenigen des Gens der ZI-Situation (59) bzw. des Chr22-5-Gens (61) abgebildet. Die Markierung der Subfragmente entspricht derjenigen in Abb.4. Waagrechte Striche markieren Sequenzidentität, Sequenzunterschiede sind an den entsprechenden Positionen angegeben.

Wie aus Abb.16 hervorgeht, weisen sowohl die kodierenden als auch die nicht-kodierenden Genbereiche eine starke Homologie auf. Die durchschnittliche Homologie der verglichenen Sequenzen be-

trägt 97,5%. Ferner wurden bei den untersuchten Sequenzen Mutationen gefunden, die im Vergleich mit einem potentiell funktionellen V_KI-Gen allen analysierten Genen gemeinsam sind: Das Startcodon ATG ist zum Codon ACA (Chr1- und cos118-Region) oder zum Codon ACG (ZI und V_KI-Gen Chr22-5 der Chr22-Region) mutiert. Bemerkenswert dabei ist, daß in allen untersuchten Fällen das Nukleotid T durch das Nukleotid C ausgetauscht ist. Zudem sind in allen fünf verglichenen Sequenzen die gleichen drei invarianten Aminosäuren ersetzt worden : Im FR3 befinden sich an Stelle der invarianten Aminosäuren Valin (Codon GTT), Glycin (Codon GGC) und Serin (Codon AGC) die Aminosäuren Isoleucin (Codon ATT), Asparaginsäure (Codon GAC) bzw. Arginin (Codon CGC).

Die Ergebnisse aus den Sequenzvergleichen lassen den Schluß zu, daß die analysierten V_K-Gene wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorläufer haben, bei dem sich die oben beschriebenen Mutationen ereignet hatten. Es ist unwahrscheinlich, daß die gleichen Austausche dreimal unabhängig voneinander in der Evolution zustandegekommen sind.

2.5. Die konservierten 5'-Flanken einiger transponierter V_KI-Gene enthalten ARS-Elemente

Die Daten aus den Restriktionskarten- und Sequenzvergleichen einiger transponierter V_K-Gene (2.4.2., 3.4.) deuten auf die Möglichkeit hin, daß diese Gene ein gemeinsames Vorläufergen haben, das im Verlauf der Evolution amplifiziert wurde. Da alle untersuchten Orphongene die Intronsequenzen sowie die 5'- und 3'-regulatorischen Sequenzen enthalten (Abb.15 und 16), scheiden alle Amplifikationsmodelle, bei denen RNA-Zwischenprodukte involviert sind, aus. Ein Amplifikationsmechanismus, bei dem nur DNA-Zwischenstufen beteiligt sind, ist die sogenannte Überreplikation (62-65). Bei diesem hypothetischen Mechanismus werden die amplifizierten DNA-Kopien durch mehrere Initiationen der DNA-Replikation in einem Zellzyklus erzeugt, so daß Zwiebelschalen-ähnliche Strukturen entstehen. In Übereinstimmung mit dem postulierten

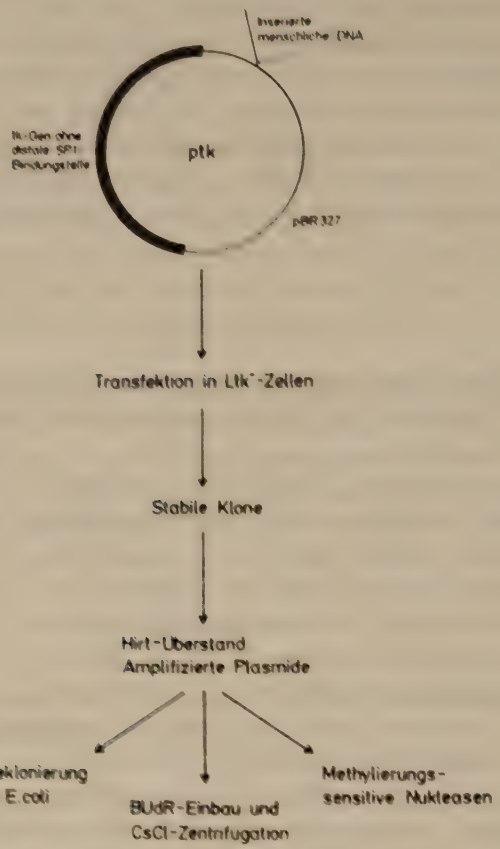
Überreplikationsmechanismus müssen die amplifizierten DNA-Bereiche funktionelle Replikationsursprünge oder ARS-Elemente (autonomously replicating sequences) enthalten. Um zu prüfen, ob die konservierten Bereiche der Orphonregionen durch Überreplikationsereignisse entstanden sind, wurden mehrere Fragmente aus dem entsprechenden Bereich der Chr1-Region auf ARS-Aktivität hin analysiert. Das dazu verwendete Testsystem wurde in der Arbeitsgruppe von Professor F. Grummt, Universität Würzburg, etabliert (66); die Tests wurden von W. Siwka, Universität Würzburg, durchgeführt.

2.5.1. Mehrere Fragmente aus der konservierten 5'-Flanke des Gens der Chr1-Region weisen eine ARS-Aktivität auf

Prinzip des ARS-Tests. Das Prinzip des Tests (Abb.17) beruht darauf, daß tk^--L-Zellen (Abkürzungsverzeichnis) nur dann in HAT-Medium wachsen können, wenn das eingeführte ptk-Plasmid funktionelle eukaryontische ARS-Elemente besitzt. Das ptk-Plasmid enthält neben pBR327-Sequenzen den codierenden Bereich des Thymidinkinase-Gens des Herpes simplex Virus 1-Genoms (HSV-1), sowie 80 bp der 5'-Sequenzen des Genbereichs. Diese 5'-Sequenzen weisen nur eine der beiden SP1-Bindungsstellen (70) auf. Dadurch wird die Transkriptionseffizienz drastisch erniedrigt, so daß die L-Zellen mit dem ptk-Plasmid allein nicht zu tk^+ transformiert werden können. In Gegenwart eines funktionellen ARS-Elements auf dem ptk-Vektor kann die niedrige Effizienz des Promotors des Thymidinkinase-Gens durch eine hohe Kopienzahl ausgeglichen werden.

Um auszuschließen, daß die mit dem Testsystem selektionierten Fragmente eine Transkriptions-Enhancer-Aktivität besitzen, wurden verschiedene Analysen durchgeführt, die im Diskussionsteil 3.6. beschrieben sind.

Abb.17: Schematische Darstellung des Prinzips des ARS-Testes

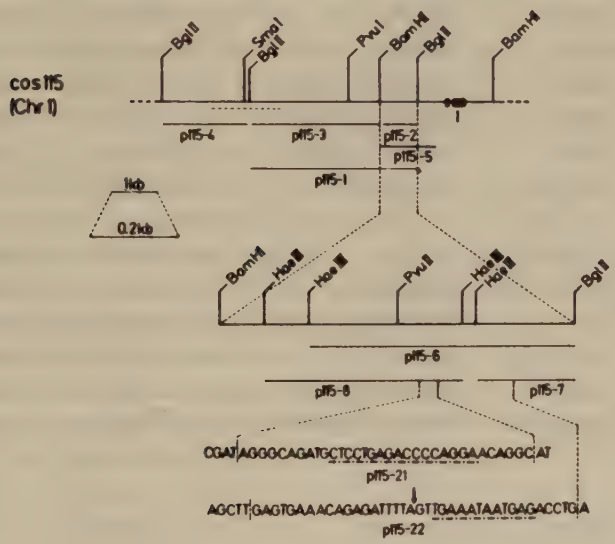


Das in der Abb. dargestellte ARS-Testsystem wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Grummt, Universität Würzburg etabliert (66). Das ptk-Plasmid sowie die einzelnen Schritte des Tests sind gezeigt.

Replikationstest einiger Fragmente aus der Chr1-Region. Um die Frage nach möglichen ARS-Elementen innerhalb der konservierten Orphonbereiche zu klären, wurden zunächst fünf Fragmente aus der Chr1-Region untersucht, die Bereiche aus der konservierten 5'-Flanke darstellen. Diese Fragmente, 115-1 bis 5, wurden isoliert

und in den pBR327-Anteil des ptk-Plasmids kloniert. Die Lage der klonierten Fragmente innerhalb der Chr1-Region ist in Abb.18 dargestellt, die Größen der Fragmente sowie die Daten der ARS-Untersuchungen sind in Tabelle 4 gegeben.

Abb.18: Replikatorfragmente und synthetische Oligonukleotide der Chr1-Region



In Abb.18 ist der Bereich der Chr1-Region, aus dem die Replikatorfragmente stammen, dargestellt. Die untersuchten Fragmente sind durch Linien markiert. Das Fragment 115-5 stellt ein BamHI-PstI-Fragment dar. Da die Chr1-Region nicht mit dieser Restriktionsnuklease kartiert wurde, wurde die entsprechende PstI-Spaltstelle in der Karte nicht eingezeichnet. Das HindIII-Fragment, dessen Bereich durch eine gestrichelte Linie markiert ist, stammt aus der cos118-Region. Aufgrund der Flankenhomologie entspricht es dem angezeigten Bereich der Chr1-Region. Dieses HindIII-Fragment ist im Replikationstest positiv wie auch das entsprechende Chr1-Fragment. Die Feinkartierung des 115-2-Fragments ist unterhalb der Chr1-Restriktionskarte vergrößert dargestellt. Die Lage der Subfragmente sowie die Sequenzen der Oligonukleotide 115-21 und 115-22 sind angegeben.

Tabelle 4: Schematische Zusammenstellung der Replikatorklone der Chr1-Region und deren Aktivitäten im ARS-Test

Plasmide	Fragment-länge (bp)	Klonierungs-stelle im ptk-Vektor	tk^+-Klone pro Platte	Kopien pro tk^+-Zelle
p115-1	3700	BamHI*	5,0 (45/ 9)	270±120 (5)
p115-2	839	BamHI	4,8 (86/18)	340±320 (11)
p115-3	2900	BamHI	2,2 (33/15)	130± 90 (7)
p115-4	1800	BamHI	1,5 (22/15)	100± 60 (5)
p115-5	1300	BamHI/HindIII	4,2 (50/12)	240±189 (6)
p115-6	644	BamHI(a)/SalI	7,9 (95/12)	430±290 (6)
p115-7	248	BamHI(a)/SalI	12,3(147/12)	320±130 (5)
p115-8	456	BamHI(a)	4,0 (48/12)	240±120 (5)
p115-21	39	ClaI	2,8 (25/ 9)	430±170 (6)
p115-22	44	HindIII	2,9 (26/ 9)	330±170 (5)
p115-23	122	ClaI/HindIII	4,8 (43/ 9)	240± 70 (5)
p115-24	156	ClaI	2,3 (21/ 9)	150±100 (3)
p115-25	264	HindIII	6,2 (56/ 9)	230±210 (4)
p115-26	239	ClaI/HindIII	4,3 (26/ 6)	310±120 (4)
ptk	-	-	0,1 (4/36)	nd
p146-3	2700	BamHI	0,0 (0/ 6)	-

Die Bezeichnung der Plasmide entspricht derjenigen in Abb.18. Die Klone p115-23 bis 26 enthalten Multimere oder Kombinationen der 115-21- und 115-22-Oligonukleotide: p115-23, 2x115-21 plus 1x115-22; p115-24, 4x115-21; p115-25, 6x115-22; p115-26, 1 bis 5x115-21 plus 1x115-22 (einige der 115-21-Kopien wurden während der Propagation der Plasmide deletiert).
Die Längen der Fragmente wurden entweder durch Restriktionsspaltung oder durch Sequenzanalyse bestimmt. Die synthetischen Oligonukleotide der Klone p115-21 und p115-22 weisen an ihren Enden ClaI- bzw. HindIII-Restriktionsspaltstellen auf. Die Längen dieser Fragmente sowie diejenigen der Klone p115-23 bis 26 sind somit aufgrund der zusätzlichen Nukleotide länger als die eigentlichen Chr1-Sequenzen. Alle Fragmente und Oligonukleotide sind bis auf eine Ausnahme (115-1) in den ptkI-Vektor kloniert, das Fragment 115-1 wurde in die BamHI-Stelle des ptkII-Vektors (*) ligiert. Der Buchstabe (a) hinter der Klonierungsstelle des ptk-

Vektors bedeutet, daß die betreffenden Fragmente in die aufgefüllte Restriktionsspaltstelle des Vektors kloniert wurden. Das Fragment 115-5 stellt ein BamHI-PstI-Spaltprodukt dar (Abb.18), das zunächst in einem M13-Vektor kloniert wurde. Aus diesem Klon wurde das Fragment mit den Restriktionsnukleasen BamHI und HindIII herausgespalten. In der Spalte "tk^+-Klone pro Platte" sind die Gesamtzahlen der Kolonien und der Platten jeweils in Klammern gesetzt. Die Spalte "Kopien pro tk^+-Zelle" enthält die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die Anzahl der Kopienzahlbestimmungen, deren Werte in Klammern gesetzt sind.

Die Ergebnisse der Replikationsuntersuchungen zeigen, daß die fünf analysierten Fragmente im Test positiv sind. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, liegt die Anzahl der tk^+-Klone pro Platte zwischen 1 und 5. Die Kopienzahl der rekombinanten ptk-Plasmide pro Zelle bewegt sich zwischen 100 und 350. Zwischen der Anzahl der tk^+-Klone pro Platte und der Kopienzahl scheint kein Zusammenhang zu bestehen.

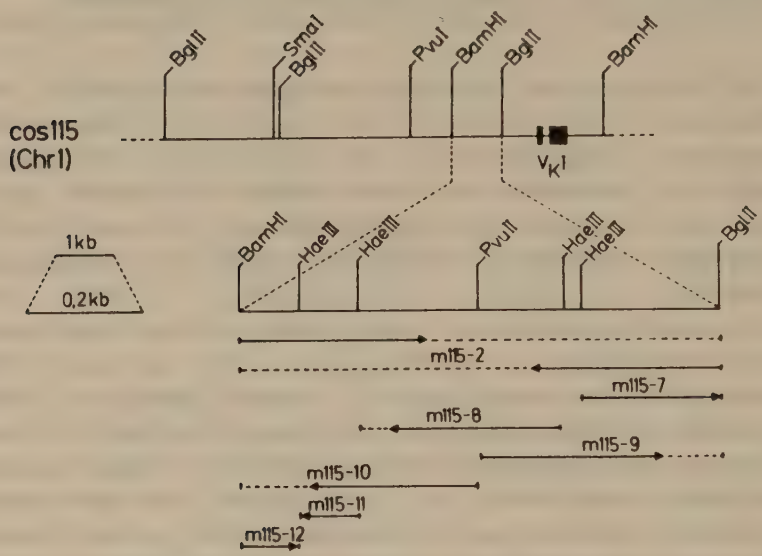
Als negative Kontrollen dienten das ptk-Plasmid ohne zusätzliche DNA-Sequenzen und der Klon p146-3 (47), der die 5'-Flanke eines V_KI-Gens der O-Regionen (O_9) enthält (Tabelle 4). Während der Klon p146-3 negativ in den Replikationsanalysen ist, weist das ptk-Plasmid eine Transformationseffizienz von 0,1 pro Platte auf. Diese geringe Transformationseffizienz kann durch eine chromosomale Integration des ptk-Plasmids erklärt werden. Dadurch ist es möglich, daß benachbarte Enhancer- oder Promotor-Elemente die schwache Aktivität des tk-Promotors kompensieren.

2.5.2. Einengung der für die ARS-Aktivität verantwortlichen Sequenzen

Sequenzanalyse und Charakterisierung des Replikatorfragments 115-2. Mit Hilfe des Replikationstests sind von der Arbeitsgruppe von Professor F. Grummt, Universität Würzburg, die muARS-Elemente ("murine autonomously replicating sequences") etabliert worden (66). Um zu klären, ob die Replikationsaktivität der positiven Fragmente der Chr1-Region ebenfalls auf in der Sequenz verwandte Elemente zurückgeführt werden kann, wurde das Replikatorfragment 115-2 sequenziert. Dabei wurden dieselben Prinzipien angewendet

wie bei der Sequenzanalyse von V_K-Genen (2.3.1.). Die Sequenzierungsategie ist in Abb.19 dargestellt, die Daten zu den Sequenzierungsklonen können aus Tabelle 2 entnommen werden.

Abb.19: Sequenzierungsstrategie des Fragments 115-2

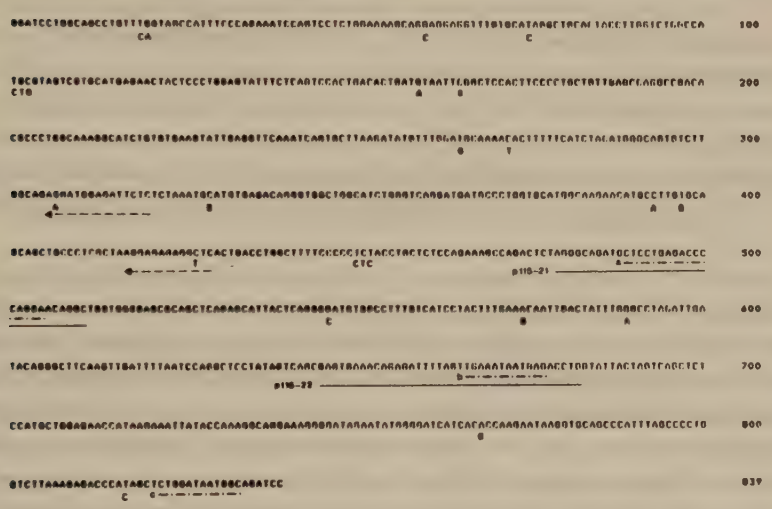


Die Feinkartierung des 115-2-Fragments ist unter der Chr1-Restriktionskarte gezeigt. Die Längen der Fragmente der Sequenzierungsklone sind durch ausgezogene und gestrichelte Linien angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Sequenzierungsrichtung, die ausgezogenen Linien markieren den sequenzierten Bereich.

Die Sequenz 115-2, die in Abb.20 dargestellt ist, wurde zunächst ohne Computerhilfe nach interessanten Sequenzelementen abgesucht. Dabei stellte sich heraus, daß eine muARS-ähnliche Sequenz, das CTC-Element, in der Sequenz einmal vorkommt (Abb.20; a). Im Vergleich zur Consensussequenz des muARS-Motivs, $CTC^{A}_{T}GAGA^{GG}_{CC}AA$ (66) sind die Teilelemente CTC, GAG und AGGAA konserviert, die Art und Anzahl der Nukleotide zwischen diesen Teilelementen sind jedoch unterschiedlich (Tabelle 5). Darüberhinaus weist das sequenzierte Fragment zwei Sequenzelemente auf, die mit der

NFIII-Bindungsstelle des Adenovirus 2 verwandt sind (67; Abb.20, b und c) und im folgenden Text als NFIII-Elemente bezeichnet werden. NFIII (nuclear factor III; Ref.67), der sowohl einen Transkriptions- als auch einen Replikationsfaktor darstellt, erhöht bei der Replikation des Adenovirus-Genoms die Replikationseffizienz (68). Im Vergleich zur NFIII-Bindungssequenz des Adenovirus 2, welche die Sequenz TATGATAATGAG (67) umfaßt, sind im Falle des Sequenzmotivs b (Abb.20) 9 von 12, im Falle des Sequenzmotivs c (Abb.20) 7 von 12 Nukleotiden konserviert (Tabelle 5).

Abb.20: Sequenz des Fragments 115-2



Die CTC- (a) und NFIII-Elemente (b und c) sind durch "strichpunktierte" Linien angegeben, die gestrichelten Pfeile kennzeichnen zwei CTC-ähnliche Motive, welche jedoch im Vergleich zum CTC-Element (a) in der entgegengesetzten Orientierung vorliegen. Die Oligonukleotide 115-21 und 115-22 sind durch ausgezogene Linien markiert. Die Sequenzunterschiede zum Replikatorfragment 218-2 der Chr22-Region (51) sind unterhalb der 115-2-Sequenz angegeben.

Tabelle 5: Vergleich der CTC- und NFIII-Elemente der 115-2-Sequenz mit anderen Sequenzelementen

Mensch CTC-Element (115-2-Sequenz)	(a)	CTC CT GAG ACCCC AGGAA
Consensussequenz der muARS-Elemente		A GG CTC GAG A AA T CC
Mensch NFIII-Element (115-2-Sequenz)	(b)	TGAAATAATGAG
	(c)	CTGGATAATGGC
Adenovirus 2 NFIII-Bindungsstelle		TATGATAATGAG

Das CTC-Element (a, Abb.20) wird mit der muARS-Consensussequenz (66) verglichen; die NFIII-Elemente (b und c, Abb.20) werden mit der NFIII-Bindungssequenz des Adenovirus 2 (67) verglichen.

Mit den Computeranalysen wurde nach Homologien zwischen der Sequenz 115-2 und den folgenden DNA-Sequenzen gesucht: Enhancer des SV40-Virus (Übersicht Ref.69), SP1-Bindungsstellen (70), Matrix- und Topoisomerase II-Bindungsstellen (71, 72). Während Enhancer-Sequenzen und SP1-Bindungsstellen die Transkriptionseffizienz erhöhen, werden Matrix- und Topoisomerase II-Bindungsstellen als mögliche eukaryontische Replikationsursprünge diskutiert. Die computerunterstützte Suche zeigte jedoch keine signifikante Homologie zwischen der Sequenz 115-2 und den oben aufgeführten Sequenzmotiven.

Konstruktion und Replikationstest verschiedener Teilsequenzen des 115-2-Fragments. Mit den folgenden Analysen sollte geklärt werden, welches der beiden mutmaßlichen Sequenzmotive, das CTC- oder das NFIII-Element, für die Replikationsaktivität des 115-2-Frag-

ments verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde das 115-2-Fragment mit der Restriktionsnuklease HaeIII partiell gespalten, die Spaltprodukte wurden isoliert und in den Vektor ptk kloniert. Die Daten zu den aus diesem Ansatz erstellten Klonen p115-6 bis 8 können aus Abb.18 und Tabelle 4 entnommen werden.

Der Klon p115-6 enthält beide Motive, das CTC-Element a und die NFIII-Elemente b und c, der Klon p115-7 enthält die beiden NFIII-Elemente b und c, der Klon p115-8 weist das CTC-Element a auf (Abb.18 und 20). Die Replikationstests dieser Klone zeigen, daß alle drei Fragmente fähig sind, tk^--L-Zellen zu tk^+ zu transformieren. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die Bereiche der gefundenen Sequenzelemente a und b (Abb.20) für die Replikationsaktivität verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden 31 bzw. 34 bp lange synthetische Oligonukleotide erstellt, die den Bereich des Motivs a (115-21) bzw. des Motivs b (115-22) umfassen. Wiederum konnte sowohl bei den Oligonukleotiden 115-21 und 115-22 als auch bei den verschiedenen Kombinationen und Multimeranordnungen (Klone p115-23 bis 26) eine Replikationsaktivität nachgewiesen werden. Die Transformationseffizienzen dieser Klone und die Kopienzahlen pro Zelle sind vergleichbar mit denen der Klone p115-1 bis 8 (Tabelle 4).

Die Replikationsanalysen der Teilsequenzen des 115-2-Fragments zeigen, daß sowohl das CTC- als auch das untersuchte NFIII-Element die Replikation des extrachromosomalen ptk-Plasmids im Testsystem initiieren können. Hinsichtlich der Evolution der menschlichen V_K-Orphongene können diese Daten so interpretiert werden, daß die Art der ARS-Elemente sowie deren Kombination bei der Entstehung der Orphonregionen möglicherweise eine Rolle gespielt haben.

3.Diskussion

3.1 Ziele der Untersuchungen zur Struktur des menschlichen K-Locus

Die Strukturaufklärung des menschlichen K-Locus, die von der Arbeitsgruppe von Professor Zachau durchgeführt wird, basiert auf der Klonierung aller V_K-Gensegmente sowie auf der Festlegung ihrer Lage und Orientierung innerhalb des Locus. Dadurch sollte es einerseits möglich sein, den Beitrag der V_K-Genzahl zur Entstehung des funktionellen Antikörper-Repertoires zu bestimmen. Andererseits sollte durch Kenntnis der Anordnung und der Orientierung der V_K-Gensegmente innerhalb des Locus die Entscheidung zwischen den verschiedenen postulierten Mechanismen der V-J-Umlagerung erleichtert werden.

Zur Strukturaufklärung des menschlichen K-Locus wurden in einem ersten Schritt mehrere Genbanken mit Subgruppen-spezifischen V_K-Proben sowie mit Extensionssuchklonen abgesucht. Dadurch wurden V_K-Gen-haltige Cosmidklone erhalten, die zu verschiedenen V_K-Regionen zusammengefasst werden konnten. In weiterführenden Schritten wurde die chromosomale Anordnung dieser etablierten V_K-Regionen mit Hilfe der PFG-Elektrophorese (Pulsfeld-Gelelektrophorese) untersucht. Die bis dahin erhaltenen Ergebnisse der Strukturanalysen zeigen, daß größere Teile des menschlichen K-Locus in duplizierter Form vorliegen und daß einzelne V_K-Gensegmente innerhalb des Locus in unterschiedlicher 5'-3'-Polarität vorkommen.

In den Rahmen dieser Arbeiten fügen sich drei Gruppen von Versuchen ein, die in der vorliegenden Dissertation beschrieben werden. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierten Regionen A, L, O und W, die durch mehrere Cosmidklone dargestellt werden und zahlreiche V_K-Gene aufweisen, konnten erwartungsgemäß dem Chromosom 2, auf dem der K-Locus lokalisiert worden war (1, 2), zugeordnet werden. Zudem war es möglich, im Zusammenhang mit diesen Lokalisierungsanalysen ein Ligierungsartefakt in den O-Regionen zu

identifizieren. Im weiteren wurden zwei genomische Regionen, die jeweils nur durch einen Cosmidklon repräsentiert sind, analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß die eine Region, die cos108-Region, auf Chromosom 2 liegt. Die chromosomale Lage der zweiten Region, der cos138-Region ist noch nicht bekannt. Wie aus Versuchen von E. Huber und A. Meindl hervorgeht, gibt es Hinweise dafür, daß die cos108-Region möglicherweise eine Extension der L-Regionen darstellt (40, 45). Die beiden duplizierten Gene A11 und A27 der A-Regionen, die in der vorliegenden Arbeit sequenziert wurden, sind aus folgendem Grund interessant: Durch Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, daß das Gen A27 für den variablen Teil der leichten Kette eines Rheumafaktors, die IgM-Moleküle darstellen, codiert (40). Mit diesen Analysen konnte somit eines der für Rheumafaktoren codierenden Gensegmente innerhalb des K-Locus lokalisiert werden.

3.2 Identifizierung von Ligierungsartefakten mit Hilfe chromosomaler Lokalisierungsanalysen

Im Verlauf der Analysen des menschlichen K-Locus wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Zachau mehrere Cosmid-Genbanken konstruiert, die mit verschiedenen Proben nach V_K-Gen-haltigen rekombinanten Cosmidklonen abgesucht wurden. Obwohl bei der Erstellung der Genbanken das Konstruktionsprinzip so gewählt wurde, daß Ligierungsartefakte weitgehend vermieden werden (49, 54), konnten bei der genaueren Charakterisierung einiger Cosmidklone zwei verschiedene Arten von Ligierungsartefakten nachgewiesen werden: (a) Integration von mehreren Vektorkopien in einem rekombinanten DNA-Molekül; (b) artifizielle Ligierung verschiedener genomischer Fragmente untereinander. Während Ligierungsartefakte, bei denen mehrere Vektorkopien in einem Cosmidklon vorliegen, durch Restriktionskartierung und Hybridisierungsexperimente relativ einfach festgestellt werden können, ist der Nachweis verschiedener genomischer Fragmente in einem rekombinanten DNA-Molekül schwierig. Eine Methode, um Ligierungsartefakte dieser Art zu identifizieren, ist die chromosomale Lokalisierungsanalyse unter der Voraussetzung, daß die beiden ligierten Fragmente von ver-

schiedenen Chromosomen stammen. Da der haploide Chromosomensatz des menschlichen Genoms aus 23 Chromosomen besteht, ist es jedoch eher unwahrscheinlich, daß bei solchen Ligierungsartefakten zwei genomische Fragmente desselben Chromosoms aneinander ligiert werden.

Ligierungsartefakte beider Arten können bei Regionen ausgeschlossen werden, die durch mehrere Überlappende Cosmidklone dargestellt werden. Es ist unwahrscheinlich, daß sich derselbe Ligierungsartefakt mehr als einmal ereignet. Wie unsere Erfahrung bei den Analysen des menschlichen K-Locus zeigt, stellen Regionen, die nur durch einen Cosmidklon charakterisiert sind, häufig artifizielle Ligierungsprodukte dar. Es ist jedoch nicht zwingend, daß solche Regionen artifiziell entstanden sein müssen. Wegen der nicht-statistischen Verteilung der Restriktionsspaltstellen im Genom ist es möglich, daß bestimmte genomische Regionen in Genbanken weniger häufig vorkommen als andere.

3.3. Anzahl der transponierten und nicht-transponierten V_K-Gene

Die chromosomalen Lokalisierungsanalysen menschlicher V_K-Regionen haben gezeigt, dass ein Teil der V_K-Gene außerhalb des K-Locus liegt. Die vorläufige Gesamtzahl der transponierten Gene, die sich aus den Gensequenzen der Chr1-, der Chr22- und der cos118-Region sowie derjenigen der vier Mitglieder der Z-Familie zusammensetzt, beträgt elf. Da jedoch die Analysen der Chr1-Region und der Z-Familie darauf hindeuten, daß die entsprechenden Regionen weitere Mitglieder im Genom aufweisen (3.7., Ref.40, 59), dürfte die Anzahl der transponierten V_K-Gene im menschlichen Genom grösser sein.

Bis jetzt wurden im K-Locus 80 V_K-Gene identifiziert (31, 44, 46). Der Vergleich der beiden Zahlenwerte zeigt, daß mehr als 10% der menschlichen V_K-Gene außerhalb des K-Locus liegen. Mit dieser Feststellung wird deutlich gemacht, daß die Bestimmung der genauen Genzahl eines Locus nicht durch quantitative Hybridisierungen durchgeführt werden kann, da mit dieser Methode auch die

transponierten Gene mitgezählt werden. Um einen verläßlichen Wert über die exakte Genzahl eines Locus zu erhalten, ist es daher notwendig, den Locus zu klonieren und zu charakterisieren.

Quantitative Hybridisierungsexperimente lassen sich in den Fällen anwenden, in denen die gesamte Genzahl einer Multigenfamilie bestimmt werden soll. In diesem Zusammenhang spielt es keine Rolle, ob die Mitglieder der entsprechenden Familien alle in einem Locus organisiert sind oder ob sie verstreut auf verschiedenen Chromosomen vorliegen. Da jedoch alle V_K-Gene, die außerhalb des Chromosoms 2 liegen, nach den Umlagerungsmodellen nicht umgelagert werden können, tragen nur diejenigen V_K-Gene direkt zur Vielfalt der Antikörper bei, die im K-Locus liegen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, im Falle der V_K-Multigenfamilie zwischen transponierten und nicht-transponierten Genen zu unterscheiden.

3.4. Gemeinsame Vorläuferregion der transponierten V_K-Regionen

Im Hinblick auf einen möglichen Evolutionsmechanismus, der zu den V_K-Orphonregionen geführt hat, wurden die Restriktionskarten der entsprechenden Regionen sowie einige der gesprungenen Gensequenzen miteinander verglichen. Die dabei erhaltenen Daten waren vereinbar mit der Hypothese, daß die Orphonregionen oder Teile davon von einem gemeinsamen Vorläufer stammen.

Vergleich der flankierenden Sequenzen der V_K-Genbereiche. Eine charakteristische Eigenschaft der Orphonregionen sind die konservierten Bereiche, die ein V_K-Gen der Subgruppe I enthalten und sich zum Teil über weite genomische Abschnitte erstrecken (Abb.21). Die konservierten Bereiche zwischen den Mitgliedern der Z-Familie umfassen auf der 5'- und auf der 3'- Seite des Gens insgesamt mindestens 30 kb (59), bei den entsprechenden Genen der Chr1-, der cos118- und der Chr22-Region weisen die konservierten 5'-Flanken eine Mindestlänge von 5 kb auf. Die Homologie auf der 3'-Seite der Gene der Chr1- und der cos118-Region scheint kurz

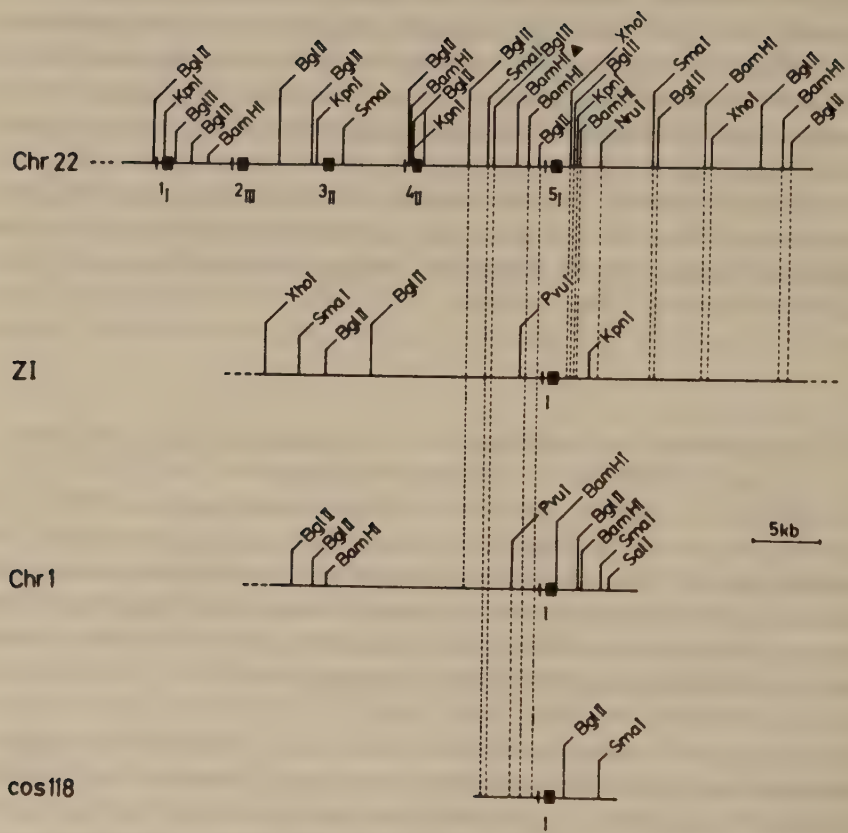

Chr 22
BglII
KpnI
BglII
BglII
BamHI
BglII
BglII
KpnI
SmaI
BglII
BamHI
BglII
KpnI
BglII
SmaI
BglII
BamHI
BglII
KpnI
BamHI
BglII
BamHI
NruI
XhoI
SmaI
BglII
BamHI
XhoI
BglII
BamHI
BglII
1
2
3
4
5
ZI
XhoI
SmaI
BglII
BglII
PvuI
KpnI
1
Chr 1
BglII
BglII
BamHI
PvuI
BamHI
BglII
BamHI
SmaI
SalI
5kb
1
cos118
BglII
SmaI
1

Abb.21: Vergleich der Restriktionskarten transponierter V_K-Gene

Die Restriktionskarten der Chr1- (54, 56), der Chr22- (56, 73), ZI (59) und der cos118-Region (56, vorliegende Arbeit) werden durch Cosmidklone repräsentiert. Die genomischen Regionen werden durch horizontale Linien und die V_K-Gene durch ausgefüllte Balken dargestellt. Die Restriktionsspaltstellen, die zwischen den genomischen Regionen konserviert sind, sind durch vertikale gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die BamHI-Stelle in der Chr22-Region, die durch ein Dreieck markiert ist, ist bei allelischen Varianten nicht vorhanden.

nach dem codierenden Genbereich abzubrechen. Im Gegensatz dazu weist das Chr22-5-Gen der Chr22-Region in diesem Bereich eine Homologie zu den entsprechenden Bereichen der Mitglieder der Z-Familie auf, welche sich über mindestens 15 kb erstreckt.

Wie Restriktionskartenvergleiche von V_K-Gen-tragenden Cosmiden zeigen, sind die konservierten Flankenabschnitte charakteristisch für die untersuchten menschlichen V_K-Orphons. Solche Flankenabschnitte wurden, anhand von Restriktionskartenvergleichen, bis zum jetzigen Zeitpunkt in keiner etablierten V_K-Region des K-Locus gefunden. Die Hybridisierungsexperimente mit einem Fragment aus der konservierten 5'-Flanke der Chr1-Region (115-2, Abb.18) zu den V_K-haltigen Cosmiden zeigen jedoch, daß außer den entsprechenden Orphonregionen verwandte Bereiche in den O-und W-Regionen vorkommmen, die mit der Probe hybridisieren. Die Intensitäten dieser Signale sind jedoch im Vergleich zu denjenigen der Orphonregionen deutlich schwächer. Zudem entsprechen die Größen der hybridisierenden Fragmente der O- und W-Regionen nicht denjenigen der Orphonregionen. Diese beide Punkte legen den Schluß nahe, daß es sich bei den zusätzlichen Signalen um weiter entfernte Flankenhomologien handeln könnte. Es ist bis jetzt allerdings nicht bekannt, ob die kreuzhybridisierenden Regionen des K-Locus an der Entstehung der Orphonregionen beteiligt waren.

Sequenzvergleich. Die Sequenzvergleiche einiger transponierter V_K-Gene (das Gen der Chr1-, der cos118- bzw. der ZI-Region sowie das Chr22-5-Gen der Chr22-Region) zeigen eine ausgeprägte Ähnlichkeit. Die durchschnittliche Homologie der untersuchten Sequenzen beträgt 97,5%.

Die Verwandtschaft dieser Gene liegt ungefähr in demselben Grössenbereich wie diejenige von duplizierten oder allelischen V_K-Genen des K-Locus (44). Im Gegensatz dazu ist die Homologie zwischen zwei beliebigen nicht-allelischen und nicht-duplizierten V_K-Genen deutlich geringer. So ging aus einem V_KI-Genvergleich einschließlich der Chr22-5-Sequenz (61) hervor, dass deren durchschnittliche Homologie ungefähr 90% beträgt (61). Bei beiden Vergleichen wurden zusätzlich zum Strukturgenbereich 120 bp der 5'-Flanke und 170 bp der 3'-Flanke in den Vergleich mit einbezogen.

Weiter kann durch den Sequenzvergleich gezeigt werden, daß die vier analysierten Sequenzen dieselben Mutationen im Vergleich zu einem potentiell funktionellen V_KI-Gen aufweisen (2.4.2.). Da es sehr unwahrscheinlich ist, daß die gleichen vier Positionen unabhängig voneinander abweichen, wird ein hypothetisches Vorläufergen postuliert, bei dem sich die Mutationen ereignet haben.

Aufgrund der Daten aus den Restriktionskarten- und Sequenzvergleichen bilden die konservierten Bereiche der Orphonregionen eine Gruppe von eng verwandten Sequenzen, deren Evolution am einfachsten durch Amplifikation einer Vorläuferregion erklärt werden kann.

3.5. Überreplikation als möglicher Mechanismus der Entstehung der menschlichen V_K-Orphonregionen

Bei der Analyse des menschlichen K-Locus wurden V_K-Gene außerhalb des Locus gefunden. Für die Entstehung transponierter Gene bei anderen Multigenfamilien, die auf die gleiche Weise wie die V_K-Genfamilie organisiert sind, wurden hauptsächlich zwei verschiedene Mechanismen diskutiert: Insertion von Retrotranskripten (cDNAs) und Mobilität über Transposons (74).

Gene, die über Insertion von Retrotranskripten amplifiziert und transponiert worden sind, weisen sich dadurch aus, daß die Intronsequenzen und die weiter entfernten 5'- und 3'-Flanken fehlen. Beispiele zu diesem Mechanismus bilden die prozessierten

menschlichen $J_\lambda C_\lambda$- (75) und C_ε-Pseudogene (76, 77), die außerhalb der jeweiligen Cluster gefunden wurden. Darüberhinaus deuten neuere Analysen darauf hin, daß viele der eukaryontischen Transposons ebenfalls über RNA-Zwischenproduke transponiert werden. So konnte beim Ty-Element der Hefe gezeigt werden, daß bei der Transposition künstlich eingesetzte Intronsequenzen eliminiert werden (78). Auch bei den Copia-Elementen von Drosophila gibt es eindeutige Hinweise dafür, daß die Transposition über ein RNA-Transkript erfolgt (79). Ferner scheinen auch die Alu-Sequenzen über Transposon-artige Ereignisse des erwähnten Typs transponiert zu werden, bei denen mögliche RNA-Zwischenprodukte bei der Transposition diskutiert werden (80). Da die V_K-Orphongene die Intronsequenzen enthalten, scheiden alle Mechanismen, bei denen RNA-Zwischenstufen beteiligt sind, aus.

Zusätzlich zu der Insertion von Retrotranskripten werden weitere Amplifikations- und Transpositionsmechanismen postuliert, die nur DNA-Zwischenprodukte beinhalten. So weisen die invertierten Sequenzen, die bei einigen nicht-prozessierten V_K-Genen im K-Locus gefunden wurden, darauf hin, dass möglicherweise eine weitere Form von Transposon-artigen Prozessen bei der Entstehung dieser Gene beteiligt war (11). Ein solcher Mechanismus kann für die Evolution der V_K-Orphonregionen nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch keinerlei Hinweise für Transposons vorlagen, konzentrierten sich die weiterführenden Analysen der V_K-Orphons hauptsächlich auf einen Überreplikationsmechanismus. Überreplikation oder disproportionierte Replikation (62-65) wurde als Amplifikationsmechanismus für verschiedene eukaryontische Gene, die in amplifizierter Form im Genom vorkommen, diskutiert. Es wird davon ausgegangen, daß im ersten Schritt des Amplifikationsprozesses mehrere Replikationsinitiationen in einem Zellzyklus ablaufen. Die nachfolgenden Rekombinationsprozesse lösen die aus dem ersten Schritt entstandene "Zwiebelschale" auf und führen zu den amplifizierten chromosomalen oder extrachromosomalen DNA-Sequenzen.

In Übereinstimmung mit diesem hypothetischen Amplifikationsmechanismus müssen innerhalb der überreplizierten Bereiche funktionelle Replikationsursprünge lokalisiert sein. Der Nachweis von ARS-Sequenzen ("autonomously replicating sequences") in den kon-

servierten Orphonbereichen gibt daher zusätzlich zu den strukturellen Daten Anlaß zu der Spekulation, daß die Amplifikation der V_K-Orphons des Menschen auf einem Überreplikationsprozess beruht.

3.6. Unterschiedliche Sequenzmotive besitzen ARS-Aktivität

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen ARS-Elemente werden in diesem Kapitel sowohl im Zusammenhang mit viralen Replikationsursprüngen als auch im Hinblick auf eine mögliche Kopplung von Replikation und Transkription diskutiert. Ein weiterer Diskussionspunkt des Kapitels befasst sich mit den Frequenzen, mit denen ARS-verwandte Elemente in menschlichen und viralen Sequenzen vorkommen.

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden Kontrollversuche beschrieben, die im Zusammenhang mit den ARS-Untersuchungen der Replikatorfragmente der Chr1-Region durchgeführt wurden. Da jedoch diese Experimente von W. Siwka, Universität Würzburg, gemacht wurden, werden sie nicht im Ergebnisteil, sondern im Diskussionsteil aufgeführt.

Die Replikatorplasmide werden in Maus-L-Zellen repliziert. Maus-L-Zellen können mit den im Kapitel 2.5. beschriebenen rekombinanten ptk-Plasmiden zu tk^+ transformiert werden. Diese Transformation kann einerseits darauf beruhen, daß die schwache Aktivität des Promotors des Thymidinkinase-Gens durch eine hohe Kopienzahl ausgeglichen wird. Andererseits ist es möglich, daß die schwache Effizienz des Promotors durch "Enhancer"-Elemente (69) oder durch SP1-Bindungsstellen (70) kompensiert wird, wodurch Ltk^--Zellen ebenfalls zu tk^+ transformiert werden können. Um die letztgenannte Möglichkeit auszuschließen, wurden von W. Siwka, Universität Würzburg, folgende Tests durchgeführt: (i) MboI-Sensitivität der Plasmid-DNA. Die in E. coli-Zellen replizierte DNA wird durch die Restriktionsnuklease MboI nicht gespalten, da das Nukleotid A in deren Erkennungssequenz methyliert ist. In eukaryontischen Zellen

fehlt jedoch die A-Methylase, so daß die entsprechenden Nukleotide in den L-Zellen nicht methyliert werden. Aus diesem Grund ist die in L-Zellen replizierte DNA MboI-sensitiv. (ii) Um sicherzustellen, daß die in L-Zellen eingeführte DNA nicht demethyliert und dadurch MboI-sensitiv wird, wurde der Einbau von BUdR (7. Abkürzungsverzeichnis) in das Replikatorplasmid p115-2 gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß nach 24- bzw. 48-stündigem Zellwachstum ein "Dichteshift" im extrahierten Plasmid in Gegenwart von BUdR erfolgt. Die LL-, HL- und HH-Formen (7. Abkürzungsverzeichnis) der p115-2-Plasmid-DNA wurde mit Hilfe einer Hybridisierung in den verschiedenen Fraktionen nachgewiesen. Als Hybridisierungsproben dienten entweder das ptk-Plasmid oder das Replikatorfragment 115-2. Mit beiden Proben wurden dieselben Ergebnisse erhalten. Daraus geht deutlich hervor, daß die p115-2-Plasmide in L-Zellen repliziert worden sind.

In weiteren Analysen wurden die Kopienzahlen der rekombinanten Plasmide pro transformierte Zelle festgelegt. Dazu wurden die Plasmide ungefähr 60 Tage nach der Transfektion aus L-Zellen isoliert. Durch quantitative Hybridisierungen wurden die Kopienzahlen bestimmt, deren Werte sich im Mittel auf einige hundert belaufen. Diese Zahlen können nur durch eine Replikation in L-Zellen erklärt werden, da sonst die 40000 Plasmide, die pro L-Zelle transfiziert wurden, nach ungefähr 16 Zellteilungen herausverdünnt worden wären. Zudem kann durch verschiedene Restriktionsspaltungen gezeigt werden, daß die aus L-Zellen isolierten Plasmide identisch sind mit den Ausgangsplasmiden. Darüberhinaus weisen die Plasmide, die aus L-Zellen isoliert werden, die gleiche E. coli-Transformationseffizienz auf wie die Ausgangsplasmide.

Mit diesen Ergebnissen kann gezeigt werden, daß die schwache Effizienz des tk-Promotors durch eine erhöhte Kopienzahl der rekombinanten ptk-Plasmide kompensiert wird. Zudem sind offensichtlich die Replikationssysteme des Menschen und der Maus kompatibel, da die menschlichen ARS-Elemente ebenso aktiv sind in Mauszellen wie die ARS-Elemente der Maus im homologen System.

Unterschiedliche Sequenzelemente können vom eukaryontischen Replikationsapparat erkannt werden. Die Replikationstests der untersuchten Fragmente und Oligonukleotide der Chr1-Region zeigen, daß unterschiedliche Sequenzelemente die Replikation von extrachromosomalen Plasmiden initiieren können. Hinweise darauf gab es schon in früheren Untersuchungen über Replikationsursprünge von Eukaryonten-Viren. Bei derartigen Viren unterscheiden sich nicht nur die Sequenzelemente der Replikationsursprünge, sondern auch die Replikationsmechanismen. So stellt das SV40-Genom, das aus einem doppelsträngigen, zirkularen DNA-Molekül besteht, ein einziges Replikon dar (Übersicht Ref.81). Für die Replikation dieses Genoms wird das Replikationssystem der Wirtszelle benutzt. Vom Virus selber wird nur das T-Antigen bereitgestellt, das für die Replikationsinitiation essentiell ist.

Weitere Viren, die sich in eukaryontischen Zellen vermehren, sind die Adenoviren (Übersicht Ref.81). Das Genom der Adenoviren besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül. Die beiden Replikationsursprünge, die dieses Genom enthält, befinden sich jeweils an den Enden des linearen DNA-Doppelstrangs. Eine genaue Analyse der Replikationsursprünge zeigt, daß sich diese aus drei verschiedenen Elementen zusammensetzen (68, 82). Ein Element ist für die basale Aktivität des Replikationsursprung verantwortlich, während die beiden anderen Elemente durch Bindung von NFI- bzw. NFIII eine Erhöhung der Replikationsaktivität zur Folge haben.

Die Parvoviren, die sich ebenfalls in eukaryontischen Zellen vermehren, enthalten als Genom ein einzelsträngiges DNA-Molekül (83). Diese Viren stellen eine weitere Möglichkeit dar, wie die Replikation in eukaryontischen Zellen initiiert werden kann. Das "Self-priming"-Modell geht davon aus, daß sich an den DNA-Enden "Haarnadel"-Strukturen bilden. Dadurch ist es möglich, daß am 3'-Ende des DNA-Stranges der Elongationsprozess der Replikation stattfinden kann. Für diesen hypothetischen Mechanismus werden keine RNA-Primer benötigt (83). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für die Replikation der Chromosomen-Telomere vermutet, da bei den entsprechenden Bereichen " nicked hairpins" nachgewiesen wurden (83).

Diese drei Beispiele zeigen, daß verschiedene Sequenzelemente die Replikation in eukaryontischen Zellen initiieren können. Dieser Befund steht im Einklang mit der Tatsache, daß auch in genomischer DNA unterschiedliche Sequenzmotive als ARS-Elemente wirken können.

Das NFIII-Element weist eine Sequenzhomologie zur NFIII-Bindungsstelle auf. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß das NFIII-Element eine Replikationsaktivität im verwendeten System aufweist. Da NFIII sowohl einen Replikations- als auch einen Transkriptionsfaktor darstellt (68, 82), liegt die Hypothese nahe, daß die Replikation und Transkription möglicherweise gekoppelt sind. Dafür spricht der Befund, daß transkribierte Gene früher im Zellzyklus repliziert werden als inaktive Gene (84). Ein weiteres Indiz für eine Kopplung der Replikation mit der Transkription ist, daß bei der Replikation des Polyoma-Virus-Genoms der Transkriptions-"Enhancer" notwendig ist (85).
Diese Daten führen zu der Spekulation, daß bestimmte Promotor- und "Enhancer"-Elemente entweder in Kombination mit weiteren Sequenzelementen oder alleine funktionelle ARS-Elemente bzw. Replikationsursprünge bilden können.

Vorkommen von CTC-und NFIII-ähnlichen Elementen im Humangenom. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß bei der Entstehung der V_K-Orphonregionen die gefundenen ARS-Elemente möglicherweise eine Rolle gespielt haben. Mit den folgenden Computeranalysen sollte in erster Linie die Frage geklärt werden, ob die Kombination der ARS-Elemente spezifisch ist für die V_K-Orphonregionen. Zudem sollten im Hinblick auf mögliche Replikationsursprünge die Distanzen zwischen ARS-Elementen ermittelt werden.

In einem ersten Durchgang wurden die humane bzw. die virale Sequenzbank, die 1,2 bzw. 1,5 Mb umfassen, nach dem CTC- bzw. dem NFIII-Element b (Tabelle 5) abgesucht. Es stellte sich heraus, daß von den beiden Elementen nur das letztere einmal in der menschlichen Sequenzbank vorkommt.

Da sich das NFIII-Element im Vergleich zu der NFIII-Bindungsstelle des Adenovirus 2 in den Positionen 2,3 und 4 unterscheidet (Tabelle 5), wurde in einem weiteren Durchgang nach Sequenzen gesucht, bei denen die unterschiedlichen Nukleotide durch beliebige ersetzt sind. Parallel dazu wurde auch nach dem CTC-Element mit eingefügten Variablen ($CTC_{1,2}GAG_{0bis5}AGGA$) gesucht, die aufgrund des Vergleichs der muARS-Consensussequenz und des CTC-Elements der 115-2-Sequenz festgelegt wurden (2.5.2.; Tabelle 5). Folgende Ergebnisse wurden erhalten: Das NFIII-verwandte Element wurde in der Humangenbank 10mal, in der viralen Sequenzbank 23mal gefunden. Das CTC-verwandte Element wurde in den Humansequenzen 83mal und in den viralen Sequenzen 56mal identifiziert. Weiter konnte gezeigt werden, daß in keinem Fall die Distanz zwischen den NFIII-verwandten und CTC-verwandten Elementen kleiner ist als fünf kb. Nach diesen Daten scheint die gefundene Kombination der ARS-Elemente in der Chr1-Region spezifisch für die Orphonregionen zu sein. Diese Vermutung wird durch Hybridisierungsexperimente mit den synthetischen Oligonukukleotiden, die entweder das CTC- oder das NFIII-Element enthalten, verstärkt. In diesem Zusammenhang konnte F.-J. Zimmer zeigen, daß von den V_K-Gen-haltigen Regionen, die eine Länge von insgesamt einem Mb aufweisen, nur die Orphonregionen dieselbe Kombination aufweisen wie die Chr1-Region (51).
Diese Ergebnisse unterstützen die Spekulation, daß der spezielle Charakter der Orphonregionen bezüglich der Anordnung der ARS-Elemente eine wichtige Rolle bei der postulierten Überreplikation gespielt hat.

Die Distanzen zwischen Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten betragen 50-330 kb (86). Hybridisierungsexperimente der radioaktiv markierten CTC- und NFIII-Elemente zu den klonierten V_K-Regionen zeigten, daß der mittlere Abstand zwischen zwei CTC- bzw. zwischen zwei NFIII-verwandten Elementen, 20 bzw. 115 kb beträgt (51). Es ist jedoch nicht bekannt, ob jede dieser Sequenzen Replikationsaktivität besitzt. Ebenfalls ist nichts darüber bekannt, wieviele andere Typen von ARS-Elementen im menschlichen Genom noch vorkommen und ob ARS-Elemente identisch sind mit funktionellen Replikationsursprüngen. Es kann nicht ausge-

schlossen werden, daß ARS-Elemente nur in Kombination mit einer bestimmten Anordnung der Chromatinstruktur einen funktionellen, chromosomalen Replikationsursprung bilden.

3.7. Evolution der menschlichen V_K-Orphonregionen

Die Daten der Orphonanalysen sind mit der Hypothese vereinbar, daß bei der Evolution der Orphonregionen ein V_K-Gen der Subgruppe I amplifiziert und transponiert wurde. Das Evolutionsmodell, das in Abb.22 dargestellt ist, geht davon aus, daß die fünf Gene der Chr22-Region in einem Ereignis auf Chromosom 22 transponiert wurden. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Kopie der Chr22-Region im K-Locus gefunden wurde, ist es möglich, daß diese Transposition nicht duplikativ verlaufen ist. In einem weiteren Ereignis wurde das Vorläufergen der konservierten Orphongene, das entweder im K-Locus oder in der Chr22-Region lokalisiert ist, amplifiziert und transponiert. Weitere Amplifikationen und Transpositionen des postulierten dislozierten Vorläufergens führten zu der Chr1- bzw. zu der Z-Familie.

Im Falle der Chr1-Familie sind alle Mitglieder auf Chromosom 1 lokalisiert. Da sich die einzelnen Kopien nicht oder nur geringfügig voneinander unterscheiden (54), konnte die Anzahl der Mitglieder der Chr1-Familie nur indirekt bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden die Kopien des Genbereichs und des Bereichs des Lokalisierungsklons durch quantitative Hybridisierungsexperimente ermittelt. Aus diesen Analysen geht hervor, daß beide untersuchten DNA-Bereiche mehr als einmal im menschlichen Genom vorkommen (40, 51). Darüberhinaus konnte F.-J. Zimmer zeigen, daß die Kopienzahl im Bereich des Lokalisierungsklons bei verschiedenen Individuen aufgrund unterschiedlicher Intensitätsverhältnisse der Hybridisierungssignale variieren kann. Diese Erkenntnis basiert auf Hybridisierung des Lokalisierungsklons zu 23 genomischen DNAs, die von verschiedenen Individuen stammen. Im weiteren zeigen die Kopienzahlbestimmungen der Chr1-Region, daß

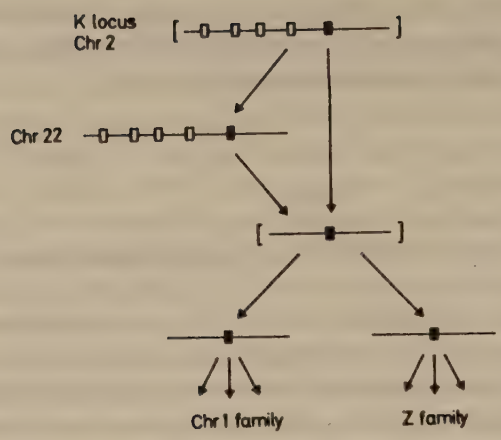


Abb.22: Modell der Evolution der menschlichen V_K-Orphonregionen

Offene Kästchen stellen die Gene Chr22-1 bis 4 der Chr22-Region dar. Die konservierten V_K-Gene der Chr22-, Chr1- und Z-Regionen sind durch ausgefüllte Kästchen gekennzeichnet. Die Regionen, die in Klammern angegeben sind, repräsentieren eine hypothetische Vorläuferregion und ein mögliches Zwischenprodukt.

zusätzlich zum konservierten Kernbereich der Orphonregionen die benachbarten Chromosom 1-Sequenzen bei der Evolution der Chr1-Familie mit amplifiziert wurden. Da im Unterschied zu der Z-Familie alle Chr1-Kopien auf demselben Chromosom liegen, ist es möglich, daß neben Überreplikationsereignissen auch ungleiche Schwesterchromatid-Austausche bei der Entstehung der Chr1-Familie eine Rolle gespielt haben.

Die unterschiedlichen Chr1-Kopienzahlen bei den untersuchten Individuen deuten darauf hin, daß die Entstehung der Chr1-Familie eher auf jungen Ereignissen beruht. In Übereinstimmung damit steht die ausgeprägte Ähnlichkeit der Kernbereiche der Orphonregionen, die ebenfalls auf junge Ereignisse schließen lassen. Das Faktum aber, daß die Orphonregionen bei allen untersuchten Individuen vorkommen, kann auch mit einem alten Ereignis in Ver-

bindung gebracht werden. In diesem Falle könnten Genkonversions-artige Ereignisse zu den großen Ähnlichkeiten in den Kernbereichen geführt haben. Zudem kann die Schätzung des evolutionären Alters der menschlichen V_k-Orphonregionen durch die Möglichkeit zusätzlich erschwert werden, daß die Orphonregionen nicht in einem Amplifikationsereignis entstanden sind, sondern in mehreren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Evolution stattgefunden haben. Aus diesen Gründen kann über das Alter der menschlichen V_k-Orphonregionen keine Aussage gemacht werden.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Enzyme

Bactoagar und Bactotrypton lieferte Difco, Michigan, USA; Hefe-Extrakte wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Seakem Agarose und Seaplaque Agarose stammten von Marine Colloids, Rockland, USA. Alle anorganischen Reagenzien sowie Ethidiumbromid, SDS, Polyethylenglykol 6000 und Tris wurden von Merck, Darmstadt, bezogen. Ampicillin ("Amblosin") kamen von Bayer AG, Leverkusen. Die Firma Sigma GmbH, München, lieferte Polyvinylpyrrolidin, Rinderserumalbumin (BSA) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid (X-gal). Von Serva, Feinbiochemika, Heidelberg, stammte Acrylamid und N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED); Bisacrylamid war ein Produkt der Firma Biomol, Ilversheim. Der Mischbettjonenaustauscher AG 501-X8 lieferte die Firma Bio Rad Laboratories, Richmond, California.
Methacryloxypropyltrimethyloxysilan stammte von Wacker-Chemie, München, das Dimethyldichlorsilan von BDH Chemicals Ltd., Poole, England. Die radioaktiven Nukleotide (α-^{32}P)dATP, und (α ^{32}P)dCTP und (γ-^{32}P)ATP wurden von New England Nuclear (NEN) bezogen, ebenso Desoxy-, Didesoxyribonukleotide und Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid (IPTG). Zur Sequenzierung wurde der 17 bp M13-Einzelstrangprimer von P. L. Biochemicals, Milwaukee, USA, eingesetzt.

Alle verwendeten Restriktionsnukleasen sowie die Linkermoleküle stammten von Boehringer, Mannheim. Von derselben Firma kamen ebenfalls die folgenden Enzyme: T4-Ligase, alkalische Phosphatase (Kälberdarm), DNA-Polymerase I (Kornberg), DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), DNase I, RNase A und die Polynukleotid-Kinase.

4.1.2. Bakterienstämme, DNA-Vektoren und DNAs

Rekombinante M13-Plasmide wurden in E. Coli JM 103-Zellen (lac pro, thi, str A, sup E, end A, sbc B15, hsd R4, F'' tra D 36 pro AB, lac I^q, Z M15) propagiert. Dieser JM 103-Stamm wurde von der Firma P. L. Biochemicals, Milwaukee, USA, geliefert. Für die Propagation von rekombinanten Plasmiden und Cosmiden wurden die beiden E. coli-Stämme 490A (r_k, m_k, met^-, thr^-, leu^-, $recA^-$) und HB101 (F^-, hsdS20 (r^-B, r^-B), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-) verwendet. Der Stamm 490A wurde von G. Hobom konstruiert und zur Verfügung gestellt (87), der Stamm HB101 stellte uns D. Schümperli zur Verfügung. Die DNA der M13-Phagen mp7, mp8, mp9, mp10 und mp11 (88) stammten von der Firma P. L. Biochemicals, Milwaukee USA. Die pBR322- und pUC9-DNAs wurden bei der Firma Boehringer, Mannheim, gekauft. Lachsspermien- und E. coli-DNA lieferte die Firma Sigma GmbH, München. Die DNA aus menschlicher Plazenta-DNA (Individuum AF) wurde von H. G. Klobeck präpariert und zur Verfügung gestellt.

4.1.3. Cosmidgenbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone

Die Genbanken IIIc und IVa und IVb wurden von H.-D. Pohlenz (54) bzw. B. Straubinger (49) aus derselben Plazenta-DNA (Individuum St) konstruiert. Für die Genbank IIIc wurde die Plazenta-DNA mit der Restriktionsnuklease Sau3A partial gespalten und in die BamHI-Stelle des pHC79-Vektor (89) ligiert. Bei der Genbank IV handelte es sich um TaqI- (IVb) bzw. MspI-partial-gespaltene Plazenta-DNA (IVa), welche in die ClaI-Stelle des pHC79-Vektors kloniert wurde.

Die bereits kartierten Cosmidklone cos115 wurden von H.-D. Pohlenz (54), cos118 cos219 und cos659 von B. Straubinger (49) und cos109 von H. Smola (52) zur Verfügung gestellt. Der Cosmidklon cos108 wurde im wesentlichen von H.Smola (52) und C. Huber

(53) kartiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten menschmenschlichen V_K-Proben wurden von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe konstruiert und zur Verfügung gestellt.

4.2. Methoden

4.2.1. Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch "Nicktranslation", wie sie in Ref.90 beschrieben ist, mit (α-^{32}P)dATP, (α-^{32}P)dCTP, DNase I und DNA-Polymerase I. Um stärkere Signale bei den Hybridisierungen zu erhalten, wurden die DNA-Fragmente mit sich selber ligiert (91).

Die Endmarkierung der Oligonukleotide mit (γ-^{32}P)ATP wurde analog zu Ref.92 durchgeführt.

4.2.2. DNA-Transfer und Hybridisierung

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Methode von Southern (93) auf Filter-Membranen (GeneScreen und GeneScreen Plus von New England Nuclear, Boston) transferiert. Die DNA wurde anschließend durch Backen bei 80°C im Vakuumofen (GeneScreen-Filter) bzw. durch Trocknen (GeneScreen Plus-Filter) bei Raumtemperatur, auf den Membranen fixiert.

Die Filter für die ersten chromosomalen Lokalisierungen wurden in der Arbeitsgruppe von Professor K.-H. Grzeschik, Universität Münster hergestellt. Die dazu verwendeten Membranen stammten von Pall, Filtrationstechnik, Dreiech.

Filter-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Fragmenten wurden entweder nach Ref.27 oder Ref.28 durchgeführt.

Die Hybridisierung von Genbank- und Anreicherungsfilter, für die ebenfalls radioaktiv markierte Fragmente benutzt wurden, erfolgte nach Ref.27. Um unspezifische Hybridisierung zu vermeiden, wurde der Hybridisierungslösung E. coli-DNA (50 µg/ml) und pHC79-DNA (50 µg/ml) zugesetzt.

Das Nachwaschen der mit den radioaktiv markierten Fragmenten hybridisierten Filter erfolgte unter nicht-stringenten Bedingungen in 2xSSC oder 100 mM Natriumphosphat-Lösung (pH 7,2), unter stringenten Bedingungen in 0,1xSSC oder 40 mM Natriumphosphatlösung (pH 7,2). Die Filter wurden anschließend mit Röntgenfilmen (Fuji RX) und Verstärkerfolien (Cawo SE6) bei -70°C exponiert.

Die Hybridisierung der endmarkierten 39 bp und 44 bp langen Oligonukleotide erfolgte modifiziert nach Ref.28. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei einer Temperatur von 50°C in einer Lösung von 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,2), 7% SDS, 1% Rinderserumalbumin (BSA) und 1 mM EDTA durchgeführt. Die Konzentration der endmarkierten Oligonukleotide betrug 10 ng/ml, die Hybridisierung fand in einem Volumen von 5 ml statt. Die hybridisierten Filter wurden in einer 0,1 M Natriumphoshat (pH 7,2)- 1%-SDS-Lösung während zweimal 30 Minuten bei 50°C nachgewaschen.

4.2.3. Herstellung von Koloniefiltern

Um eine eindeutige Zuordnung der Hybridisierungssignale zu erhalten, mußten aufgrund der hohen Koloniendichte auf den Genbankplatten Anreicherungsschritte unternommen werden. Dazu wurden zwei verschiedene Verdünnungsstufen von den entnommenen Kolonien ausplattiert. Die Kolonien wurden auf Rundfilter (Colony/Plaque Screen von New England Nuclear, Boston) transferiert. Die Zell-Lyse und DNA-Denaturierung wurde durch eine NaOH-Behandlung ausgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung der freien DNA an die Filter analog zur Beschreibung in Ref.94. Die Filter wurden bei 80°C im Vakuumofen getrocknet.

Die Agarplatten, von welchen die Bakterien auf die Filter übertragen wurden, wurden bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien wieder nachgewachsen waren.

4.2.4. Präparation von DNA

Cosmidklone, pBR322-, pUC9- und M13-Klone wurden über Nacht bei 37°C in LB-Medium (10g/l NaCl, 10g/l Trypton, 5g/l Hefe-Extrakt) (95) angezogen. Zur Anzucht von Cosmid-, pBR322- und pUC9-Klonen wurde dem LB-Medium zusätzlich Ampicillin (75 µg/ml) zugegeben. Zur Anzucht von M13-Klonen wurden E. coli JM103-Kulturen in der halblogarithmischen Phase (OD_{580nm}=0,5) mit den jeweiligen M13-Phagen infiziert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Isolierung der DNAs erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Birnboim und Doly (96). Anschließend wurde ein weiterer Reinigungsschritt durch CsCl-Gradientenzentrifugation (n=1,389) im Vertikalrotor (15 Stunden/45000 rpm) angeschlossen (97). Nach der Extraktion des Ethidiumbromids mit einem CsCl-gesättigten n-Butanol/Isopropanolgemisch (1:1) wurde die DNA in der CsCl-Lösung drei- bis viermal mit TE-Puffer verdünnt und anschließend mit Isopropanol gefällt.

Die Mengenbestimmung der DNA beruhte entweder auf einer photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm (1 OD entspricht 50 µg DNA/ml) oder mit Hilfe eines Vergleichs zu einer Verdünnungsreihe von DNAs bekannter Konzentration auf Agarosegelen.

4.2.5. Präparation von Oligonukleotiden

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von R. Stucka mit einem "Biosearch 3810 DNA synthesizer" hergestellt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte nach Ref.98.

4.2.6. Restriktionsnukleasespaltungen

1 ug DNA pro analytische Spaltung wurde jeweils mit der entsprechenden Enzymaktivität während einer Stunde gespalten. Mit Ausnahme der Restriktionsnukleasen TaqI (65 C) und SmaI (25 C) wurden die Spaltungsansätze bei 37 C inkubiert. Als Spaltpuffer diente bis auf die KpnI-Spaltungen ein Universalpuffer (T. Igo-Kemenes, persönliche Mitteilung) mit folgender Zusammensetzung: 1,5 mM Spermin, 150 mM Spermidin, 150 mM Tris, 600 mM KCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA (Ethylenglycolbis(ß-aminoethylether)-N,N'-tetra-acetat), 70 mM $MgCl_2$, 5mM Mercaptoethanol. KpnI-Spaltungen wurden in dem von der Herstellungsfirma Boehringer, Mannheim empfohlenen Puffer (60 mM Tris pH7,6, 60 mM NaCl, 60 mM $MgCl_2$, 70 mM Mercaptoethanol) durchgeführt. Alle Spaltreaktionen wurden durch Zugabe von 20 Volumenprozent einer Lösung von 50 mM EDTA, 4 mM Harnstoff, 50% (w/v) Saccharose, 0,1% (w/v) Bromphenolblau beendet.

4.2.7. Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gespaltene Cosmid- und Plasmid-DNAs wurden auf Agarosegelen (Ref.99; Seakem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) aufgetrennt. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente variierte die Agarose-Konzentration zwischen 0,5- und 2%. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris/EDTA/Borat-Puffer (90 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure; Ref.100) eingesetzt.

Für die präparative Isolierung aus Agarosegelen wurde Seaplaque-Agarose (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) eingesetzt, die bei 65 C schmilzt. Die aufgetrennten Fragmente wurden aus dem Seaplaque-Agarosegel ausgeschnitten, die mit den Fragmenten ausgeschnittene Agarose wurde bei 65 C geschmolzen und mit Phenol und Chloroform extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit EtOH gefällt (101).

4.2.8. Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-, pUC9- und pBR322-Vektoren

Die M13-, pUC9- und pBR322-Vektoren wurden mit Restriktionsnukleasen linearisiert, deren Erkennungsstellen kompatibel waren mit den DNA-Enden der zu klonierenden Fragmente. Falls mit nur einem Enzym gespalten wurde, wurde anschließend eine Phosphatase-Behandlung (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Boehringer, Mannheim) durchgeführt, um dadurch ein Religieren weitgehend zu vermeiden (102).

Die Ligierung der DNA-Fragmente in die Vektoren wurden bei einem 5-fachen molaren Überschuß an DNA-Fragmenten bei 15°C während 12 Stunden ausgeführt (103).

Die Ligierung der Oligonukleotide in den ptk-Vektor erfolgte auf dieselbe Weise wie diejenige der oben aufgeführten DNA-Fragmente, jedoch mit einem 10-fachen molaren Überschuß an Oligonukleotiden.

4.2.9. Transformationen

M13-DNA-Transformationen. E. coli-Zellen des Stammes JM 103 wurden nach der Methode von Dagert und Ehrlich (104) für die Transformation von rekombinanten DNA-Klonen präpariert. Die Transformation wurde nach J. Messing (105) durchgeführt.

Rekombinante M13-Klone bilden bei dieser Methode farblose Plaques, nicht-rekombinante Klone bilden blaue Plaques (105). Rekombinante Phagen wurden mit sterilen Ösen von den Agarplatten abgenommen, in 5 ml einer logarithmisch wachsenden E. coli JM 103-Kultur (OD_{560}=0,5) übertragen und sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der doppelsträngigen Phagen-DNA aus den infizierten Bakterien erfolgte wie im Abschnitt 4.2.4. beschrieben. Die Einzelstrang-DNA, die bei der Sequenzierung (4.2.10.) als Template für die DNA-Polymerase I diente, wurde aus dem Kulturüberstand isoliert (60).

pBR322- und pUC9-Transformationen. E. coli-Zellen der Stämme 490A oder HB101 wurden ebenfalls nach der Methode von Dagert und Ehrlich (104) für die Transformation der rekominanten DNA-Klone (95) präpariert. Die Selektion der Klone erfolgte mittels Ampicillin-Resistenz. Einzelne Kolonien wurden in jeweils 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (75 µg Ampicillin/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA aus den E. coli-Zellen erfolgte auf dieselbe Weise wie im Abschnitt 4.2.4. beschrieben ist.

4.2.10. Auffüllen überhängender Enden und Linker-Addition

Falls die DNA-Enden nicht kompatibel mit denjenigen des Vektors waren, wurden die überhängenden Enden aufgefüllt und in Gegenwart von synthetischen Linkern ligiert (4.2.8.). Die Auffüllreaktion wurde mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow Enzym; Boehringer) nach Ref.95 durchgeführt. Da die verwendeten synthetischen Linkermoleküle (Boehringer) kein 5'-Phosphat aufweisen, wurden sie daher vor der Ligierung mit der Polynukleotid-Kinase (aus T4-infizierten E. coli, Boehringer) phosphoryliert.

4.2.11. Sequenzierung

Die zur Sequenzierung geeigneten Fragmente wurden anhand von Restriktionskartierungen und Hybridisierungen ermittelt und in die entsprechenden Vektoren kloniert (4.2.8.). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (60). Um radioaktiv markierte Einzelstrangbrüche zu erzeugen, die eine Länge von 500 bis 600 Nukleotide überschreiten, wurden relativ niedrige Dideoxynukleotidkonzentrationen gewählt, wie sie in Ref.106 beschrieben sind.

Die Auftrennung der synthetischen radioaktiv markierten Einzelstrangmoleküle erfolgte auf 6% Acrylamidgelen (107). Als Puffer wurde ein Tris-Borat-Puffer (133 mM Tris, 88 mM Borat, 2,5 mM

EDTA) verwendet. Mit drei unterschiedlich lang dauernden Elektrophoresen auf 40 cm langen Gelen (1,5 kV, Raumtemperatur) war es möglich, zwischen 350 bis 400 Nukleotide zu sequenzieren. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C mit Fuji RX-Filmen.

4.2.12. Computerprogramme

Die Sequenzdaten der V_k-Gene wurden mit Hilfe eines PDP-11/23-Prozessors (RT 11-System, Digital Equipment) ausgewertet. Die verwendeten Programme, DNTRAN (Translation einer Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz) und DNMAHO (Erzielen größtmöglicher Homologie zwischen DNA-Sequenzen) stammten von P. S. Neumeier (44).

Die Sequenz des 115-2-Replikators wurde mit Hilfe einer MicroVAX (Digital Equipment Corporation) analysiert und mit bekannten Sequenzen verglichen; die dazu benötigten UWGCG (Version 4) Programme umfassten BestFit, Find Wordsearch und Segments. Für diese Sequenzvergleiche wurde die GenBank (release 44) benutzt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen beschrieben, die sich hauptsächlich auf genomische Regionen konzentrieren, die einzelne variable Gensegmente für leichte Immunglobulinketten vom K-Typ (V_K-Gene) aufweisen. Durch chromosomale Lokalisierungsanalysen konnte gezeigt werden, daß ein Großteil dieser V_K-Regionen außerhalb des K-Locus liegt. Daraufhin wurde die chromosomale Zuordnung der von der Arbeitsgruppe von Professor Zachau charakterisierten V_K-Regionen systematisch überprüft. Um Hinweise auf einen Mechanismus zu erhalten, der zu den transponierten V_K-Regionen geführt haben könnte, wurden die entsprechenden Regionen detailliert untersucht. Diese Untersuchungen umfassten Restriktionskartenvergleiche, Tests auf autonom replizierende Fragmente (ARS-Tests) sowie Sequenzanalysen.

Den Ausgangspunkt der Arbeit bildete die Charakterisierung einiger V_K-Regionen, die einzelne V_K-Gensegmente aufweisen. Zunächst konnten zwei Regionen durch Restriktionsanalysen den O-Regionen des K-Locus zugeordnet werden. Bei zwei weiteren Regionen, der Chr1- und der cos118-Region wurden die Genkarten durch "chromosomal walking"-Experimente extendiert. Dabei stellte sich heraus, daß die benachbarten Bereiche beider Regionen keine weiteren V_K-Gensegmente mehr enthalten. Die Sequenzdaten der V_KI-Gene der Chr1- und der cos118-Region zeigten, daß das erstgenannte Gen aufgrund der codierenden Nukleotidsequenz potentiell funktionell ist; das Gen der cos118-Region weist im codierenden Bereich ein Stoppcodon auf.

In weiteren Sequenzanalysen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem zwei duplizierte V_KIII-Gene der A-Regionen des K-Locus (A11 und A27) sequenziert. Aus den Sequenzdaten ging hervor, daß beide Gene potentiell funktionell sind. Zudem konnte durch Sequenzvergleiche gezeigt werden, daß sowohl das Gen A11 als auch das Gen A27 umgelagert werden. Im Falle von A27 konnte das Keimbahn-Gensegment dem variablen Teil der leichten Kette eines Rheumafaktors zugeordnet werden.

Einen Schwerpunkt der Arbeit bildete die Überprüfung der chromosomalen Lage der menschlichen V_K-Regionen. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß einige der menschlichen V_K-Gensegmente außerhalb des K-Locus auf den Chromosomen 1 (Chr1-Region) und 22 (Chr22-Region) sowie auf anderen Chromosomen (Z-Familie) vorkommen. Die chromosomalen Lokalisierungsanalysen beruhten auf Hybridisierung spezifischer Proben zu DNAs von 29 Hybridzellinien. Da sich die Karyotypen der verwendeten Zellinien voneinander unterscheiden, konnte anhand des Segregationsmusters der Hybridisierungssignale die chromosomale Lage der entsprechenden Proben festgelegt werden.

Im Anschluss an den interessanten Befund des Vorhandenseins transponierter V_K-Regionen im menschlichen Genom konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf Mechanismen, die zu den V_K-Orphonregionen geführt haben könnten. Zunächst wurden die entsprechenden Restriktionskarten sowie einige der transponierten Gensequenzen miteinander verglichen. Zwei der verglichenen Sequenzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt. Die Vergleiche zeigten, daß alle bis dahin gefundenen V_K-Orphonregionen stark konservierte Bereiche mit jeweils einem V_K-Gen der Subgruppe I enthalten. Die durchschnittliche Homologie dieser V_K-Gene, die bis zum jetzigen Zeitpunkt sequenziert worden sind, beträgt 97,5%. Zudem erwiesen sich die konservierten Bereiche als charakteristisch für die transponierten V_K-Regionen, da durch Restriktionskartenvergleiche und Hybridisierungsexperimente kein zu den Orphonregionen verwandter Bereich im K-Locus gefunden wurde. Sowohl die konservierten Bereiche der transponierten V_K-Regionen als auch die hohe Sequenzhomologie der verglichenen Sequenzen führten zu der Hypothese, daß die Orphonregionen einen gemeinsamen Vorläufer gehabt haben.

In einem weiteren Schritt erfolgten Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Amplifikationsmechanismus, mit dem die strukturellen Daten der Orphonregionen am besten erklärbar sind. Da alle bis jetzt sequenzierten V_K-Orphongene die Intronsequenzen enthalten, scheiden all diejenigen Mechanismen aus, die RNA-Zwischenstufen enthalten. Ein Amplifikationsmechanismus, bei dem nur

DNA-Stufen beteiligt sind, ist die sogenannte Überreplikation. Die amplifizierten Bereiche werden nach diesem Mechanismus durch mehrere Replikationsinitiationen in einem Zellzyklus erzeugt. Um zu prüfen, ob die Orphonregionen ARS-Elemente ("autonomously replicating sequences") enthalten, wurden zunächst mehrere Fragmente aus dem konservierten Bereich der Chr1-Region auf ARS-Aktivität hin analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Chr1-Region mehrere Fragmente mit einer diesbezüglichen Aktivität aufweist. Das ARS-Testsystem, das auf einem Gendosis-Effekt in Mauszellen beruht, wurde von der Arbeitsgruppe von Professor Grummt, Universität Würzburg, etabliert; die Tests wurden von W. Siwka, Universität Würzburg, durchgeführt.

In den nächsten Experimenten wurde eines der ARS-positiven Fragmente der Chr1-Region auf Sequenzebene analysiert. Mit Hilfe von Teilsequenzen und synthetischen Oligonukleotiden konnten erstmals im menschlichen Genom Sequenzelemente definiert werden, die eine ARS-Aktivität aufweisen. Es wurden zwei Motive gefunden; das eine, das wir CTC-Element nennen, ist mit der ARS-Consensussequenz des Mäusegenoms verwandt, das andere Motiv weist eine Homologie zur Bindungsstelle des Transkriptions- und Replikationsfaktors NFIII auf und wird daher NFIII-Element genannt.

Eine computerunterstützte Suche nach CTC- und NFIII-verwandten Elementen in menschlichen und viralen Sequenzen zeigte erwartungsgemäß, daß beide Elemente sowohl in der menschlichen als auch in der viralen Sequenzbank vorkommen. Eine Kombination mehrerer ARS-Elemente der beiden Typen, wie sie im untersuchten Fragment vorliegt, wurde jedoch in den Sequenzbanken nicht gefunden. Diese Daten führten zu der Hypothese, daß die spezielle Kombination der ARS-Elemente bei der Entstehung der menschlichen V_K-Orphonregionen eine Rolle gespielt hat.

6. Literaturverzeichnis

1. O. W. McBride, P. A. Hieter, G. F. Hollis, D. Swan, M. C. Otey und P. Leder. J. Exp. Med. 155, 1480-1490 (1982)

2. S. Malcolm, P. Barton, C. Murphy, M. A. Ferguson-Smith, D. L. Bentley und T. H. Rabbitts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4957-4961 (1982)

3. T. Honjo und S. Habu. Ann. Rev. Biochem. 54, 803-830 (1985)

4. M. Steinmetz, A. Winoto, K. Minard und L. Hood. Cell 28, 489-498 (1982)

5. D. H. Margulies, G. A. Evans, L. Flaherty und J. G. Seidman. Nature 295, 168-170 (1982)

6. E. T. Fritsch, R. M. Lawn und T. Maniatis. Cell 19, 959-972 (1980)

7. D. Overbach, W. J. Rutter, T. B. Shows, P. Gray, D. V. Goeddel und R. M. Lawn. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3123-3127 (1981)

8. H. Feldmann. Nucl. Acids Res. 4, 2831-2841 (1977)

9. P. D'Eustachio, O. Meyuhas, F. Ruddle und R. P. Perry. Cell 24, 307-312 (1981)

10. N. Maeda und O. Smithies. Ann. Rev. Genet. 20, 81-108 (1986)

11. M. Pech und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 12, 9229-9236 (1984)

12. M. Kimura. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press (1983)

13. G. A. Dover und D. Tautz. Phil. Trans. R. Soc. Lond. (1985)

14. P. Kourilsky. Trends Genet. 2, 60-63 (1986)

15. R. M. Winslow und W. A. Anderson. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 5th. ed., J. G. Stanbury et al., eds., McGraw-Hill (1983)

16. G. Childs, R. Maxson, R. H. Cohn, und L. Kedes. Cell 23, 651-663 (1981)

17. E. F. Vanin. Biochim. biophys. Acta 782, 231-241 (1984)

18. I. Balazs, M. Purello, D. Kurnit, K.-H. Grzeschik und M. Siniscalco. Somatic Cell molec. Genet. 10, 385-397 (1984)

19. G. Camerino, K.-H. Grzeschik, M. Jaye, K. de la Salle, P. Tolstohev, J. P. Lecocoq, R. Heilig und J. L. Mandel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 498-502 (1984)

20. B. U. Zabel, S. L. Naylor, K.-H. Grzeschik, und A. Y. Sakaguchi. Somatic Cell molec Genet. 10, 105-108 (1984)

21. S. Zeugerking, L.-L. Tsui, K.-H. Grzeschik, J. R. Riovdan und M. Buchwald. Am. J. Hum. Genet. 40, im Druck (1987)

22. C. M. Croce und H. Koprowski. J. Exp. Med. 140, 1221-1229 (1974)

23. R. Windquist, T. P. Mäkala, P. Seppanen, O. A. Jänne, L. Alhonen-Hongisto, J. Jänne, K.-H. Grzeschik und K. Alitalo. Cell Genet. 42, 133-140 (1986)

24. J. Bartels, K.-H. Grzeschik, D. N. Cooper und J. Schmidke. Am. J. Hum. Genet. 38, 280-287 (1986)

25. M. Cochet, F. Gannon, R. Hen, L. Maroteaux, F. Perrin und P. Chambon. Nature 282, 567-574 (1979)

26. H. G. Klobeck, G. Combriato und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 12, 6995-7006 (1984)

27. H. Schnell, M. Steinmetz, H. G. Zachau und I. Schechter Nature 286,170-173 (1980)

28. G. M. Church und W. Gilbert. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995 (1984)

29. H. R. Jaenichen, M. Pech, W. Lindermeier, N. Wildgruber und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 12, 5249-5263 (1983)

30. H. G. Klobeck, A. Solomon und H. G. Zachau. Nature 309, 73-76 (1984)

31. B. Straubinger, E. Huber, W. Lorenz, E. Osterholzer, W. Pargent, M. Pech, H.-D. Pohlenz, F.-J. Zimmer und H. G. Zachau. J. Mol. Biol., im Druck (1987)

32. E. A. Kabat, T. T. Wu, M. Reid-Miller, H. P. Perry und K. S. Gottesmann. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication (1987)

33. F. Falkner und H. G. Zachau. Nature 310, 71-74 (1984)

34. R. Breathnach und P. A. Chambon. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981)

35. S. Tonegawa. Nature 302, 575-581 (1983)

36. R. Breathnach und P. A. Chambon. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981)

37. P. P. Chen, K. Albrandt, N. K. Orida, V. Radoux, E. Y. Chen, R. Schrantz, F.-T. Liu und D. A. Carson. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8318-8322 (1986)

38. V. Radoux, P. P. Chen, J. A. Sorge und D. A. Carson. J. Exp. Med. 164, 2119-2124 (1986)

39. R. M. Lawn, E. F. Fitsch, R. C. Parker, G. Blake und T. Maniatis. Cell 15, 1157-1174) (1978)

40. A. Meindl, Dissertation, Fakultät für Biologie der Univertät München

41. J. Stavnezer, O. Kekish, D. Batter, I. Balazs, J. Grenier, E. Henderson und B. J. M. Zegers. Nucl. Acids Res. 13, 3495-3514 (1985)

42. H. G. Klobeck, A. Meindl, G. Combriato, A. Solomon und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 13, 6499-6513 (1985)

43. D. L. Bentley. Nature 307, 77-80 (1984)

44. M. Pech, H. R. Jaenichen, H.-D. Pohlenz, P. S. Neumeier, H.-G. Klobeck und H. G. Zachau. J. Mol. Biol. 176, 189-204 (1984)

45. E. Huber, Dissertaion, Fakultät für Biologie der Universität München

46. H.-D. Pohlenz, B. Straubinger, R. Thiebe, M. Pech, F.-J. Zimmer und H. G. Zachau. J. Mol. Biol. 193, 241-253 (1987)

47. W. Pargent, Dissertaion, Fakultät für Biologie der Universität München

48. W. Lorenz, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München

49. B. Straubinger, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München (1987)

50. C. Huber, Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München (1986)

51. F.-J. Zimmer, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

52. H. Smola, Dissertation, Fakultät für Medizin der Universität München

53. C. Huber, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

54. H.-D. Pohlenz, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München (1986)

55. H. G. Bauer, M. Pech und H. G. Zachau. Biol. Chem. Hoppe-Seiler 367, 751-755 (1986)

56. E. Lötscher, K.-H. Grzeschik, H. G. Bauer, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger und H. G. Zachau. Nature 320, 456-458 (1986)

57. A. J. Jeffreys, V. Wilson und S. L. Thein. Nature 314, 67-73 (1986)

58. T. Klopstock, Dissertation, Fakultät für Medizin der Universität München

59. B. Straubinger, R. Thiebe, M. Pech und H. G. Zachau Publikation in Vorbereitung

60. F. Sanger, A. R. Coulson, B. G. Barnell, A. J. H. Smith und B. A. Roe. J. Mol. Biol. 143, 161-178 (1980)

61. H. R. Jaenichen, W. Lindermaier, N. Wildgruber und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 12, 5249- 5263 (1984)

62. R. T. Schimke, F. W. Alt, R. E. Kellems, R. J. Kaufman und R. J. Bertino. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 649-657 (1977)

63. G. R. Stark und G. M. Wahl. Ann Rev. Biochem. 53, 447-491 (1984)

64. D. Hanahan, D. Lane, L. Lipsich, M. Wigler und M. Botchan. Cell 21, 127-139 (1980)

65. J. M. Roberts, L. B. Buck und R. Axel. Cell 33, 53-63 (1983)

66. A. Holst, F. Müller, G. Zastrow, H. Zentgraf, S. Schwender, E. Dinkl und F. Grummt. Cell (im Druck)

67. G. J. M. Prujn, W. van Driel, P. C. van der Vliet. Nature 322, 656-659 (1986)

68. P. J. Rosenfeld, E. A. O. Neill, R. J. Wides und T. J. Kelly. Mol. Cell. Biol. 7, 875-886 (1987)

69. E. Serfling, M. Jasin und W. Schaffner. Trends Genet 1, 224-228 (1985)

70. S. McKnight. Cell 31, 355-365 (1982)

71. S. M. Gasser und U. K. Laemmli. Cell 46, 521-530 (1986)

72. M. Sander und T. Hsieh. Nucl. Acids Res. 13, 1054-1071 (1985)

73. H. G. Bauer. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München (1986)

74. P. D'Eustachio und F. H. Ruddle. Science 220, 919-924 (1983)

75. G. F. Hollis, P. A. Hieter, O. W. McBride, D. Swan und P. Leder. Nature 296, 321-325 (1982)

76. J. Battey, E. E. Max, O. W. McBride, D. Swan und P. Leder. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5956-5960 (1982)

77. S. Ueda, S. Nakai, Y. Nishida, H. Hisajima und T. Honjo. EMBO J. 1, 1539-1544 (1982)

78. J. Boeke, D. J. Garfinkel, C. A. Styles und G. R. Fink. Cell 40, 491-500 (1985)

79. A. J. Flavell. Nature 310, 514-516 (1984)

80. P. Jagadeeswaran, P. B. Forget und S. M. Weissmann. Cell 26, 141-142 (1981)

81. J. L. Campbell. Ann. Rev. Biochem. 55, 733-771 (1986)

82. R. J. Wides, M. D. Challberg, D. R. Rawlins und T. J. Kelly. Mol. Cell. Biol. 7, 864-874 (1987)

83. E. A. Faust und D. C. Ward. J. Virol. 32, 293-303 (1979)

84. D. M. Gilbert. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2924-2928 (1986)

85. J. de Villiers, W. Schaffner, C. Tyndall, S. Lupton und R. Kamen. Nature 312, 242-246 (1984)

86. R. Hand. Cell 15, 317-325 (1978)

87. A. Erbslöh. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Freiburg (1974)

88. J. Messing. Methods in Enzymology 101, 20-78 (1983)

89. D. Ish-Horowicz und J. F. Burke. Nucl. Acids Res. 9, 2989-2998 (1981)

90. P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg. J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

91. J. Meinkoth und G. Wahl. Analyt. Biochem. 138, 269-284 (1984)

92. A. M. Maxam und W. Gilbert. Methods in Enzymology Vol. 65 Part 1, 499-560 (1980)

93. E. M. Southern. J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

94. M. Grunstein und D. S. Hogness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975)

95. T. Maniatis, E. T. Fritsch und J. Sambrook. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)

96. H. C. Birnboim und J. Doly. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)

97. T. Tanaka und B. Weißblum. J. Bacteriol. 121, 354-362 (1975)

98. R. Mocikat, F. G. Falkner, R. Mertz und H. G. Zachau. Nucl. Acids Res. 14, 8829-8844 (1986)

99. C. Aaij und P. Borst. Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200 (1972)

100. A. C. Peacock und C. W. Dingman. Biochem. 6, 1818-1827 (1967)

101. J. Gafner, E. M. de Robertis und P. Phillipsen. EMBO J. 2, 583-591 (1983)

102. A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter und H. M. Goodman. Science 196, 1313-1319 (1977)

103. A. Dugaiczyk, H. W. Boyer und H. M. Goodman. J. Mol. Biol. 96, 171-184 (1975)

104. M. Dagert und S. D. Ehrlich. Gene 6, 23-28 (1978)

105. J. Messing. Methods in Enzymology 101, 20-78 (1983)

106. H. R. Jaenichen. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München (1984)

107. F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)

108. H. O. Smith und D. Nathans. J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)

109. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acis, Polynucleotides and their Constituents". Eur. J. Biochem. 15, 203-208 (1970)

110. "Abbreviations and Symbols". Eur. J. Biochem. 74, 1-6 (1977)

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARS	"autonomously replicating sequences": autonom replizierende Sequenzen
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
C	konstante Region der Immunglobuline
CDR	"complementarity determing region": hypervariable Bereiche in den V-Regionen der leichten und der schweren Ketten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Natriumsalz)
FR	"framework": Regionen, die bei den variablen Anteilen der leichten und der schweren Ketten die konstanten Bereiche bilden
H-Kette	schwere Kette der Immunglobuline
HH-Form	DNA, bei der beide Stränge mit Bromdesoxyuridin substituiert sind
HL-Form	DNA, bei der nur ein Strang mit Bromdesoxyuridin substituiert ist
HZ	Hybridzellinie
kb	Kilobasenpaare (1000bp)
L-Kette	leichte Kette der Immunglobuline
LL-Form	DNA, die nicht mit Bromdesoxyuridin substituiert ist
Mb	Megabasenpaare (10^6bp)
OD	optische Dichte
Orphon	Genregion, die außerhalb des Genclusters liegt
Ref.	Referenz
Repilikator	autonom replizierendes DNA-Fragment
RFLP	"restriction fragment length polymorphism": Restriktionsfragmente, deren Größe sich aufgrund allelischer Polymorphismen unterscheiden
SDS	"sodium dodecylsulfate" (Na-Laurylsulfat)
SSC	"standard-Saline-Citrat" (150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat, pH 7,0)

Ltk^--Zellen	Maus-L-Zellen, die keine Thymidinkinase exprimieren
V	Variable Region der Immunglobuline
V_K, V_λ	Gensegmente, welche die variablen Bereiche der leichten Ketten vom K- und λ-Typ codieren

Die Cosmide, die mit einer dreistelligen Zahl gekennzeichnet sind, wurden aus den folgenden Genbanken isoliert:

cos100ff	Cosmidbank III (54), Sau3A-Partialspaltung, Vektoren: pHC79 und pJB8
cos500ff	Cosmidbank IVb (49), TaqI-Partialspaltung, Vektor: pHC79
cos650ff	Cosmidbank IVa (49), MspI-Partialspaltung, Vektor: pHC79

DNA-Fragmente werden durch die Nummern des Ursprungscosmidklons sowie durch eine zusätzliche Zahl gekennzeichnet. Die Benennung von subklonierten Fragmenten erfolgte nach dem gleichen Prinzip; der Vektor wurde in diesen Fällen durch die Buchstaben p (pBR322 oder pUC9) oder durch den Buchstaben m (M13) angegeben.

Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den in Ref.108 angegebenen Empfehlungen. Alle anderen Angaben erfolgten gemäß den Empfehlungen der "IUPAC-IUB. Comission on Biochemical Nomenclature", die in Ref.109 und Ref.110 beschrieben sind.

Lebenslauf

Name:	Lötscher
Vorname:	Erika
Gebutsdatum:	13.02.1957
Geburtsort:	Buttisholz, Schweiz
Familienstand:	ledig

Beruflicher Werdegang:

1964-1972	Primar- und Sekundarschule in Buttisholz
1972-1977	Kantonales Lehrerseminar in Luzern
1977-1978	Lehrertätigkeit an der Primarschule in Buttisholz
1978-1983	Molekularbiologie-Studium an der Universität Zürich - Diplom 1983 Diplomarbeit im Institut für Molekularbiolgie II in Zürich bei Professor M. L. Birnstiel Thema: In vivo Aktivität eines klonierten Transkriptionsterminators der Histon-H4-Gene der Maus
1983-1988	Doktorarbeit im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, bei Professor H. G. Zachau Thema: Menschliche Immunglobuline vom K-Typ-Variable Gensegmente innerhalb und außerhalb des K-Locus

Lebenslauf

Name: [illegible]

Vorname: [illegible]

Geburtsmonat: [illegible]

Geburtsort: [illegible]

Familienstand: [illegible]

Berufliches Werdegang:

1970-1977 Primär- und Sekundärschule in Rüttiswola

1977-1978 Kantonales Lehrerseminar in Lesern

1977-1978 Lehrertätigkeit an der Primärschule in Rüttiswola

1978-1983 Kulturwissenschaftliche Studien an der Universität Zürich - Diplom 1983
Mitarbeit im Institut für Polytechnologie [illegible] Prof. Dr. [illegible] Mathematik [illegible] Transformationsparameters [illegible] der Haus

1983-1988 Mitarbeit im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biologie und Zoologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, [illegible] Prof. Dr. [illegible] Thema: Mechanische Kommunikation von [illegible] Chromatin [illegible] und [illegible]